

ANWENDUNG DER
ELEKTRONENSPINRESONANZSPEKTROSKOPIE
AUF DIE MIZELLENEIGENSCHAFTEN
VON CHOLSÄURE
UND DEREN BEZUG
AUF DIE
PHARMAKAINDUZIERTE CHOLESTASE

FERDINAND PAUL PÁPA

Disbui. München

1987

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie
und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Schulz

**ANWENDUNG DER ELEKTRONENSPINRESONANZSPEKTROSKOPIE
AUF DIE MIZELLENEIGENSCHAFTEN VON CHOLSÄURE UND
DEREN BEZUG AUF DIE PHARMAKAINDUZIERTE CHOLESTASE**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Ferdinand Paul Pápa
aus München

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. A. Petter

Korreferent: Prof. Dr. W. Kraft

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite	
I.	Einleitung und Problemstellung	1
I.1.	Die Galle und ihre Funktion	3
I.2.	Gallensäuren	4
I.3.	Gallensäuresynthese und Regulation	6
I.4.	Enterohepatischer Kreislauf und Poolgröße	7
I.5.	Gallebildung und Sekretion	9
I.5.1.	Gallensäureabhängiger Gallefluß (GSAGF)	9
I.5.2.	Gallensäureunabhängiger Gallefluß (GSUGF)	11
II.	Cholestase	13
II.1.	Definition und Einteilung	13
II.2.	Morphologie der intrahepatischen Cholestase	14
II.3.	Mögliche Mechanismen der intrahepatischen Cholestase	14
II.3.1.	Veränderungen am endoplasmatischen Retikulum	15
II.3.2.	Kanalikuläre Präzipitate	15
II.3.3.	Beeinflussung des Zytoskeletts des Hepatozyten	16
II.3.4.	Permeabilitätsänderung an den Galle- wegen	16
II.3.5.	Beeinflussung von membranständigen Enzymsystemen	17
II.3.6.	Beeinflussung der Membranzusammensetzung der Leberzelle	18
II.4.	Cholestaseinduzierende Pharmaka	20
II.4.1.	Lithocholsäure	20

II.4.2.	Taurolithocholsäure	22
II.4.3.	Chlorpromazin	23
II.4.4.	Steroidhormone	
II.5.	Konsequenzen der Cholestase	27
II.6.	Folgerungen	28
III.	Membranen	29
III.1.	Biologische Membranen	29
III.2.	Künstliche Membrane	31
IV.	Pharmaka und Reagentien	34
V.	Methoden	35
V.1.	Elektronenspinresonanzspektroskopie	35
V.1.1.	Hyperfeinstruktur	37
V.1.2.	g-Wert	39
V.1.3.	Isotrope Hyperfeinstrukturaufspaltung	39
V.1.4.	Anisotrope Hyperfeinstrukturaufspaltung	40
V.2.	Spin-Label	42
V.2.1.	Fettsäure-Label 12,3	42
V.2.2.	Auswertung der Spektren mit 12,3	43
V.2.3.	Tempo-Label	45
V.2.4.	Auswertung der Spektren mit Tempo	46
V.3.	Meßgerät und Einstellung	46
V.3.1.	Temperatureinrichtung	46
V.3.2.	Fluoreszenzmessungen	47
VI.	Ergebnisse	48
VI.1.	Mizellierung von Taurocholsäure	48
VI.1.1.	Ergebnisse	49
VI.2.	Mizellierung von Taurocholsäure unter dem Einfluß von Chlorpromazin	51
VI.2.1.	Ergebnisse	51
VI.3.	Einfluß von Chlorpromazin auf die Signal- intensität des Labels 12,3	59

VI.3.1.	Ergebnisse	59
VI.4.	Untersuchungen an Gallensäure-Lipid-Mischsystemen	60
VI.4.1.	Bestimmung der Phasenumwandlungstemperatur T_U von Dipalmitoylphosphatidylcholin	60
VI.4.2.	Ergebnisse	60
VI.4.3.	Bestimmung der T_U von Mischsystemen (Gallensäure-Lipid)	61
VI.4.4.	Ergebnisse	61
VI.4.5.	Bestimmung des Einflusses von Chlorpromazin auf die T_U von Dipalmitoylphosphatidylcholin	61
VI.4.6.	Ergebnisse	62
VI.4.7.	Versuche zur Ermittlung des Schutzeffektes von Taurocholsäure gegen die Wirkung von Chlorpromazin auf die Lipidmembran	62
VI.4.8.	Ergebnisse	62
VI.5.	Laterale Phasentrennung in Lipidmischungen, dargestellt am Beispiel des 3-Phasensystems Lithocholsäure-Cholesterin-Dipalmitoylphosphatidylcholin	69
VI.5.1.	Ergebnisse des Tempo-Verteilungsdiagrammes für Na-LC/DPL = 0,10	71
VI.5.2.	Ergebnis des Phasendiagramms Cholesterin-Dipalmitoylphosphatidylcholin	71
VI.5.3.	Ergebnis des Phasendiagramms Lithocholsäure-Cholesterin-Dipalmitoylphosphatidylcholin	72
VII.	Diskussion	78
VII.1.	Versuche mit Gallensäuremizellen	78
VII.1.1.	Versuche mit gemischten Mizellen aus Taurocholsäure und Chlorpromazin	79
VII.1.2.	Versuche mit Label 12,3 und Chlorpromazin	80

VII.2.	Anwendung der Elektronenspinresonanz- spektroskopie auf Gallensäure-Phospho- lipid-Mischsysteme und deren Beeinfluss- ung durch Chlorpromazin	81
VII.2.1.	Versuche mit Gallensäure-Lipid und Gallen- säure-Chlorpromazin-Lipid-Mischsystemen	82
VII.3.	Phasendiagramm Lithocholsäure-Cholesterin- dipalmitoylphosphatidylcholin	85
VIII.	Zusammenfassung	87
	Summary	90
IX.	Literaturverzeichnis	93

I. Einleitung und Problemstellung.

Der Leber, als zentrales Stoffwechselorgan, obliegt auch die Produktion von Gallensäuren, deren Mizellierungseigenschaften essentiell für den Verdauungsvorgang sind.

Die Cholestase, die als Stagnation des Galleflusses definiert wird, was gleichbedeutend ist mit einer Sekretionshemmung von Gallensäuren, ist eine Lebererkrankung, die bei Mensch und Tier immer wieder in Erscheinung tritt.

Die Ätiologie dieser Hepatopathie ist komplex und nicht in Details bekannt. Man weiß aber, daß unter anderem verschiedene Pharmaka cholestatische Symptome auslösen.

Die Folgen der Sekretionsstörung lassen sich durch den labor-diagnostisch feststellbaren Anstieg von leberspezifischen Blutparametern, Leberfunktionstests, klinische Untersuchungen u. ä. zwar feststellen, die auf biochemischer und molekularbiologischer Ebene ablaufenden Prozesse werden hiervon jedoch nur unzureichend erfasst.

Verschiedene Forschergruppen vermuten seit einiger Zeit, daß die cholestatisch wirkenden Pharmaka in Wechselwirkung mit den Gallensäuren und dem Ort des cholestatischen Geschehens, der kanalikulären Membran der Leberzelle, treten. Durch derartige Mechanismen könnten die normalen physiologischen Vorgänge in der Leber erheblich gestört werden.

In dieser Arbeit sollte deshalb die Eignung der Elektronenspinresonanzspektroskopie als Methode zur Untersuchung der Mizelleneigenschaften der Cholsäure, bez. der Taurocholsäure geprüft werden.

Zusätzlich sollte der Einfluß des Cholestatikums Chlorpromazin auf die Mizellierung von Taurocholsäure dargestellt werden.

Dieses System sollte vom wässrigen Medium auf die Verhältnisse in einer künstlichen Membran übertragen werden. Ein in der Literatur immer wieder beschriebener Schutzeffekt von Taurocholsäure (der seinen Mizellenbildungsfähigkeiten zugeschrieben wird) gegen cholestaseinduzierende Pharmaka, sollte am Beispiel



Chlorpromazin untersucht werden.

Zusätzlich sollte mit dieser spektroskopischen Methode gezeigt werden, wie sich Eigenschaften einer künstlichen Membran aufgrund ihrer Komposition ändern und welche Schlußfolgerungen für die realen Verhältnisse in der Leber, bez. in der kanalikulären Leberzellmembran zu ziehen sind.

I.1. Die Galle und ihre Funktion

Die Galle, eine exokrine Absonderung der Leber, ist eine wässrige Lösung von Gallensäuren, Phospholipiden, Cholesterin, Gallepigmenten, anorganischen Elektrolyten und Proteinen. Die Elektrolyte entsprechen in ihrer Konzentration in etwa der des Plasmas. (Brauer, R. 1959).

Die Konzentration der einzelnen Gallensäuren beim Menschen schwankt im Bereich von 2-45 mmol/l (Thureborn, E. 1962). Die Gallensäuren sind mit Glycin und Taurin konjugiert und liegen bei einem pH-Wert der Lebergalle von über 8 als Anionen vor. Sie formen auf Grund ihres amphipathischen Charakters ab einer bestimmten Konzentration Mizellen (Hofmann, A. F., and Small, D. M. 1967). Da die Gallensäurekonzentration in der Galle die kritische mizellare Konzentration (kmK) überschreitet, liegen die Gallensäuren als Mizellen vor. Phospholipide und Cholesterin erreichen in der Galle des Menschen Konzentrationen von 1,6-8,3 mmol/l (Thureborn, E. 1962). Die Gallensäuren solubilisieren Phospholipide und Cholesterin in Form von gemischten Mizellen (Carey, M. C. and Small, D. M. 1972), da die Löslichkeit dieser beiden Komponenten im wässrigen Medium bei weitem überschritten wird.

Die Galle wird in den Leberzellen gebildet und durch die galleabführenden Wege ausgeschieden. Die kanalikuläre Galle wird während ihrer Passage in den Ductuli durch Sekretion und Reabsorption verschiedener Bestandteile in ihrer Zusammensetzung modifiziert (Boyer, J. L. 1978). Die direkt an der kanalikulären Membran entstehende Galle kann nicht gewonnen werden und ist somit in ihrer Zusammensetzung nicht bekannt. Der kanalikuläre Gallefluß kann aber durch Messung der Plasmaclearance von metabolisch inerten Substanzen bestimmt werden (Forker, E. L. 1977). Es ergeben sich unabhängig von den Spezies lineare Beziehungen zwischen Gallefluß und Plasmaclearance (Boyer, J. L. 1971).

I.2. Gallensäuren

Die in dieser Arbeit verwendeten Gallensäuren sind in Abb. 1 wiedergegeben. Als Abkömmlinge der Cholansäure besitzen sie alle ein steifes Molekulargerüst. Ihre hydrophilen Eigenschaften erhalten sie durch Einbau von bis zu drei OH-Gruppen und der Konjugation am sauren Ende mit Taurin und Glycin. Da wie z. B. im Falle der Cholsäure alle drei OH-Gruppen äquatorial stehen, also nach der gleichen Richtung weisen, ist die Gallensäure amphipathisch, d. h. sie hat eine stark polare Seite (OH-Gruppen) und eine stark apolare Seite (H, CH_3 -Gruppen); daraus resultiert ihre vorzügliche chemische Eigenschaft als Detergenz, sowohl mit polaren wie unpolaren Molekülen eine starke Wechselwirkung eingehen zu können.

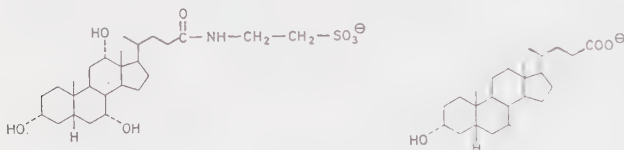


Abb.1: Taurocholsäure

Lithocholsäure

Ab einer gewissen Konzentration aggregieren Gallensäuren, um verschiedene höhermolekulare Strukturen zu bilden. Leider hat man bis heute den Ort der Mizellenbildung nicht bestimmen können. Theoretisch möglich ist die Fusion im Hepatozyten, in der kanalikulären Membran oder in den Canaliculi. Die dabei gebildeten Aggregate nennt man primäre Mizellen (Small, D. M. 1971). Sie haben eine kugelförmige Gestalt und sind aus zwei bis fünfzehn Gallensäuren zusammengesetzt.. Indem sie über ihre hydrophoben Gruppen miteinander reagieren, verkleinern sie den für sie energetisch ungünstigen Kohlenwasserstoff-Wasser-Kontakt. (Mazer, N. A. 1979). Bei höheren Gallensäurekonzentrationen, insbesondere bei höheren Ionenstärken, lagern sich die primären Mizellen mit ihren hydrophilen Seiten zusammen und bilden große, stabförmige sekundäre Mizellen (Mazer, N. A. 1979).

Gallensäuremizellen solubilisieren auch Moleküle, die kaum wasserlöslich sind, wie Cholesterin, fettlösliche Vitamine, Lecithine und sogar protonierte Gallensäuren in Form von gemischten Mizellen (Igimi, H. and Carey, M. C. 1980). Die Solubilisierungsfähigkeiten der einzelnen Gallensäuren für Cholesterin nimmt von freien Gallensäuren über Taurin- zu Glycinkonjugaten ab (Igimi, H. and Carey, M. C. 1981). Lecithine z. B., können als gemischte Mizellen im Lipid: Gallensäureverhältnis von zwei zu eins und größer solubilisiert werden (Carey, M. C. and Small, D. M. 1970). Nahe der Phasengrenze erreichen diese Aggregate Größen von bis zu 400 Å (Mazer, N. A. 1980). In solchen gemischten Mizellen sind die Konstituenten als scheibenförmige Doppelmembran angelegt. Die Gallensäuren bilden die Außenseite der Scheibe und sollen sich zusätzlich im Innern als sogenannte inverse Mizelle, das heißt, mit den polaren Seiten zueinandergekehrt, befinden.

Die Bindungsmöglichkeiten für Cholesterin an reine Gallensäuremizellen und gemischte Lecithin-Gallensäure-Mizellen unterscheiden sich dahingehend, daß sich Cholesterin an die Außenseite der einfachen Mizelle anlagert, während es bei gemischten Mizellen in ihr Inneres diffundiert (Carey, M. C. 1980). Dieses Anhaften bez. Eindringen in die Matrix verursacht lediglich eine geringe Vergrößerung des Umfangs und erfordert auch keine Umstrukturierung der Mizelle (Mazer, N. A. 1982). Wenn eine bestimmte kritische Größe der gemischten Mizelle erreicht ist (rund 400 Å), erfolgt eine Umbildung in Form von unilamellären Vesikeln oder Liposomen (Mazer, N. A. 1981; Stafford, R. J. 1981).

I.3. Gallensäuresynthese und Regulation

Der Leber, als zentrales Stoffwechselorgan, obliegt die Synthese der primären Gallensäuren, die auch gleichzeitig sehr eng mit dem Cholesterinstoffwechsel verbunden ist. Cholesterin wird von mikrosomalen Enzymen durch Hydroxylierung und Carboxylierung zu Cholsäure und Chenodeoxycholsäure umgewandelt (Gerok, W. and Matern, S. 1981). Mittels eines Rückkopplungsmechanismus, der die Konzentration der Gallensäuren im Hepatozyten berücksichtigt, wird die Synthese reguliert. An diesem Vorgang sind einerseits die Mitochondrien, wie auch das glatte endoplasmatische Retikulum, erkennbar an einer Vergrößerung der Oberflächen-dichte desselben, beteiligt. Syntheserate und Verlust über die Faeces halten sich die Waage (Heaton, K. W. 1979).

Beim Menschen werden täglich etwa 300-500 mg Cholesterin zu Gallensäuren umgewandelt. Cholsäure und Chenodeoxycholsäure werden im Verhältnis zwei zu eins gebildet. Ähnliche Verhältnisse gelten für die Ratte. In Nähe der kanalikulären Membran befindet sich ein spezielles Enzym, das die primären Gallensäuren zur Steigerung der Wasserlöslichkeit, mit Taurin und Glycin konjugiert (Abberger, H. 1978). Beim Menschen überwiegt die Glycinkomponente die von Taurin um das Dreifache (Cowen, A. E. and Campbell, C. B. 1977). Bei Ratte und Hund überwiegt die Taurinkomponente (Krocker, R. 1977; Haslewood, G. A. D. 1967).

Ein weiterer Weg zur Eliminierung von Gallensäuren besteht in der Sulfatierung, wie z. B. bei der Lithocholsäure (Gerok, W. and Matern, S. 1981). Im Darmlumen werden die primären Gallensäuren durch bakterielle Einwirkung zuerst in freie, dekonjugierte Gallensäuren und dann in die sekundären Gallensäuren Deoxycholsäure und Lithocholsäure umgewandelt (Cowen, A. E. and Campbell, C. B. 1977).

Daneben entsteht eine weitere Gallensäure, die 7-Keto-lithocholsäure; die nach Resorption aus dem Darm in der Leber zur tertiären Gallensäure Ursodeoxycholsäure reduziert wird (Gerok, W. and Matern, S. 1981).

I.4. Enterohepatischer Kreislauf und Poolgröße

Gallensäuren und Gallenfarbstoffe sind die Hauptkomponenten, die im enterohepatischen Kreislauf zirkulieren, d. h., sie werden nach ihrer Sekretion durch die kanalikuläre Membran im Darm resorbiert und nach der Passage durch die Leber erneut mit der Galle ausgeschieden. Die Hauptfunktionen der Gallensäuren im enterohepatischen Kreislauf sind:

1. Die Verminderung des Cholesteringehaltes im Plasma durch Umwandlung des Cholesterins in Gallensäuren, die durch einen Rückkopplungsmechanismus reguliert wird. Die Löslichkeit des Cholesterins in der Galle wird durch den Einbau zu gemischten Mizellen erhöht und die Ausscheidung über die Faeces begünstigt.
2. Die Resorptionsförderung von verdaulichen Fetten aus dem Darmlumen.
3. Die Erhöhung des Galleflusses über osmotische Filtrationswirkung (Erlinger, S. and Dhumeaux, D. 1974).
4. Die Regulation der Cholesterinsynthese in der Leber.

Nach der für die Sekretion der Gallensäuren unverzichtbaren Konjugation gelangen die primären Gallensäuren über die Gallenwege ins Duodenum. Der Übertritt ins Darmlumen ist abhängig vom Hydroxylierungsgrad und der Konjugation (Matern, S. and Gerok, W. 1979). Im Darmlumen werden die primären Gallensäuren bakteriell zu sekundären Gallensäuren modifiziert und abhängig vom Hydroxylierungsgrad und der Konjugation an unterschiedlichen Resorptionsorten und durch verschiedene Mechanismen aktiv oder passiv in die Pfortader aufgenommen (Schiff, E. R. 1972). So ist zum Beispiel bei der natrium-abhängigen aktiven Aufnahme der Gallensäuren die maximale

Transportgeschwindigkeit für Trihydroxygallensäuren am größten, während die unkonjugierten Gallensäuren eine höhere Transportrate haben als die konjugierten Gallensäuren. Je weniger Hydroxylgruppen eine Gallensäure besitzt, um so schneller erfolgt die passive Diffusion (Schiff, E. R. 1972).

Über das Pfortaderblut gelangen die Gallensäuren in die Leber. Der Transport im Blut erfolgt zu einem großen Teil über die Bindung an Albumin. Die Bindungsfähigkeit an Albumin ist mit der Polarität der Gallensäuren negativ korreliert (Kakis, G. 1977). Rund 35% der Gallensäuren werden in den High-Density-Lipoproteinen transportiert (Kramer, W. 1981). Die Aufnahme der Gallensäuren in die Leberzelle ist fast vollständig, so daß nur eine kleine Menge an Gallensäuren in die periphere Zirkulation gelangt (Hofmann, A. F. 1977).

Die Gallensäureaufnahme in die Leber kann in drei selbstständige Abläufe eingeteilt werden. Eine Möglichkeit läßt sich als aktiver Prozeß mit Sättigungskinetik und Natriumabhängigkeit beschreiben (Inoue, M. 1982; Reichen, J. and Paumgartner, G. 1975, 1976, 1977). Der sättigbare, natriumunabhängige Mechanismus zeigt eine hohe Spezifität für Cholsäure und Taurocholsäure und ist ebenfalls energieabhängig (Anwer, M. S. 1976a, 1976b, 1978). Der nicht sättigbare Anteil stellt wahrscheinlich eine passive Diffusion dar und ist abhängig von der Gallensäureverteilung in der Lipidphase der Membran (Anwer, M. S. 1977). Gallensäurebindende Proteine mit Molekulargewichten von 20 000 und 57 000, die offensichtlich Rezeptoren darstellen, wurden inzwischen isoliert (Kramer, W. 1981). Die Passage im Zytosol, so wird angenommen, vermitteln gallensäurenbindende Proteine (Hayes, J. D. 1979). Die treibende Kraft des enterohepatischen Kreislaufs ist die andauernde Produktion der Galle und ihre gleichzeitige Sekretion in die Gallengänge, die Kontraktion der Gallenblase, die peristaltischen Aktivitäten des Dünndarms, der aktive Transport von Gallensäuren durch die Darmwand und der venöse Fluß in der Pfortader (Hofmann, A. F. 1977).

Da dies Recyclingsystem höchst effizient arbeitet, genügt ein kleiner Gallensäurenpool, der beim Hund 50-100 mg/kg KG beträgt und 5-10 mal pro Tag zirkuliert. Die Verlustrate über den Darm beträgt rund 4% der Poolgröße. Die Größe des Pools beim Menschen liegt bei rund 2500 mg, die Zirkulationsrate beträgt 4-15 Zyklen (Northfield, T. C. and Hofmann, A. F. 1975; Mok, H. Y. I. 1977).

I.5. Gallebildung und Sekretion

Im Gegensatz zur Niere, wo die treibende Kraft für den Filtrationsdruck im Glomerulum der hydrostatische Druck im arteriellen Gefäßsystem ist, werden in der Leber für Sekretionsvorgänge aktive Mechanismen diskutiert. Gegen ein Konzentrationsgefälle werden aktiv Substanzen in die Canaliculi ausgeschieden, wobei ein osmotischer Gradient aufgebaut wird, der einen passiven Wassereinstrom in die Canaliculi bewirkt. Dieser Wassereinstrom erfolgt möglicherweise über die tight junctions.

Eine zusätzliche Möglichkeit der Ausscheidung von Gallensäuren besteht in exozytotischer Form als Mizellen (Scharschmidt, B. F. and Schmid, R. 1978).

I.5.1. Gallensäureabhängiger Gallefluß (GSAGF)

Die Lokalisation des GSAGF ist der periportale Bereich der Leber, während die Zellen des zentrolobulären Bereichs für den gallensäureunabhängigen Gallefluß zuständig sind (Gumucio, J. J. and Miller D. L. 1981).

Folgende Faktoren bestimmen den Gallefluß, bez. die Gallensäuresekretion:

1. Das vom Portalblut der Leber zugeführte Angebot an Gallensäuren (Paumgartner, G. 1974)
2. Die Kinetik der Substanzen, die von einer Passage durch den Hepatozyten betroffen sind (Erlinger, S. 1981).
3. Die Wassermenge, die durch osmotisch wirkende Substanzen nachströmt (Paumgartner, G. 1977).

Die Gallensäuren müssen an der kanalikulären Membran gegen einen Gradienten (10-100 mmol/l) in das galleabführende System sezerniert werden. Auch hier scheint ein Teil der Gallensäuresekretion über einen aktiven Transport mit Sättigungskinetik zu verlaufen (Schwarz, L. R. 1976; Poupon, R. E. 1976).

Untersuchungen an der perfundierten Rattenleber haben gezeigt, daß der GSAGF zwar vom Kationentransport abhängig ist, Natrium sich jedoch durch Lithium ersetzen läßt (Anwer, M. S. 1980). Wichtig jedoch scheint ein natriumgekoppelter Chlortransport zu sein. An hochgereinigten kanalikulären Membranvesikeln (Ratte) konnte ein natriumunabhängiges Taurocholsäuretransportsystem, das die Gallensäure als Anion durch die Membran schleust, nachgewiesen werden (Inoue, M. 1984). Eine elektrische Potentialdifferenz könnte die dafür nötige Kraft darstellen. Die Maximalkapazitäten für den Gallensäuretransport betragen 8,85 $\mu\text{mol pro min und kg KG}$ beim Hund, 14 $\mu\text{mol/min, kg KG}$ beim Schaf und 11 $\mu\text{mol/min, kg KG}$ bei der Ratte (O-Maille, E. R. L. 1965, Adler, R. D. 1977). Die Sekretion ist der limitierende Schritt der Gallebildung, da das Aufnahmevermögen der Zelle für Gallensäuren um den Faktor sechs höher ist (Paumgartner, P. 1975).

Die Abhängigkeit des Galleflusses von der Gallensäuresekretion ist nachgewiesen beim Hund (Preisig, R. 1962), der Ratte (Berthelot, P. 1970), der perfundierten Rattenleber (Boyer, J. L. 1971) und am Rhesusaffen (Dowling, R. H. 1968). Sperber, I. (1965) stellte als erster die Hypothese auf, daß Gallensäuren einen erhöhten Gallefluß bewirken, da sie Kraft ihrer osmotischen Wirksamkeit die Ausscheidung der Galle vorantreiben. Allerdings überschreitet der Quotient sez. Gallevolumen gegen sez. Gallensäurevolumen bei weitem die Wassermenge, die man erwarten würde, wenn lediglich Gallensäuren in eine isotonische Lösung abgesondert würden.

Es ist deshalb anzunehmen, daß die Galle noch andere osmotisch wirksame Substanzen enthält. Weil zusätzlich die in mizellarer Form vorliegenden Gallensäuren an osmotischer Wirksamkeit verlieren, ist der Filtrationssog zu einem beträchtlichen Teil den sie begleitenden Gegenionen zuzuschreiben (Berthelot, P. 1970).

I.5.2. Gallensäureunabhängiger Gallefluß (GSUGF)

Unterbindet man die Gallensäuresekretion in die Galle, so nimmt der Gallefluß zwar speziesunterschiedlich ab, wird aber nicht vollständig eingestellt (Dowling, R. H. 1968). Diese Restmenge wird gallensäureunabhängiger Gallefluß genannt und beträgt 40-70% (Plaa, G. L. and Priestly, B. G. 1977), bez. 40-60% (Erlinger, S. and Dhumeaux, D. 1974) der Gallegesamtmenge. Die Speziesunterschiede den Quotienten sez. Gallevolumen gegen kg KG betreffend, lassen sich durch den GSUGF erklären. Bei der Ratte ist er 10-20 mal so hoch wie bei Mensch und Hund (Erlinger, S. 1977). Die Voraussetzung dafür ist, daß sich die osmotische Wirksamkeit der Gallensäuren unterhalb ihrer kritischen mizellaren Konzentration nicht ändert. Versuche, den Zusammenhang zwischen Gallensäuresekretion und Gallefluß bei Konzentrationen nahe der kmK zu erhellen, führten zu konträren Ergebnissen (Boyer, J. L. 1971). Barbiturate beeinflussen bei Ratten den Gallefluß und die Erythrolclearance positiv, ohne die Gallensäuresekretion zu ändern. Die Gallensäuren erscheinen dabei nur in so geringer Konzentration in der Galle, daß ihr osmotischer Einfluß auf die Sekretion ohne Belang ist (Klaassen, C. D. 1971), d. h. Barbiturate beeinflussen den GSUGF. Sie erhöhen gleichzeitig in in vivo Versuchen die Aktivität der Na-K-ATPase (Simon, F. R. 1977). Dieses Enzym ist mit dem aktiven Natriumtransport gekoppelt (Schwarz, A. 1975) und befindet sich an der basolateralen Membran des Hepatozyten (Latham, P. S. and Kashgarian, M. 1979). Im Gegensatz

dazu erbrachten Versuche mit Chlorpromazin an Rhesusaffen (Ros, E. and Carey, M. C. 1972; Samuels, A. M. and Carey, M. C. 1978) und Östrogenen, verabreicht an Ratten (Davis, R. A. 1978), eine dosisabhängige Hemmung des Galleflusses bei gleichzeitiger Aktivitätsabnahme des Enzyms. Der GSUGF wird von verschiedenen Autoren mit dem aktiven Natriumtransport in Verbindung gebracht, da mit Hemmstoffen des Enzyms (Quabain, Ethacrinsäure) der GSUGF in vitro unterbrochen werden kann (Graf, J. 1972, 1978).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den Mechanismus des GSUGF bietet der Bikarbonattransport. Versuche an der perfundierten Rattenleber mit bikarbonatfreien Lösungen reduzieren den GSUGF um 50%, wohingegen bei Hunden ein Anstieg von Bikarbonat in der Galle bei gleichzeitig erhöhtem GSUGF nach Verabreichung des Choleretikums SC-2644 nachgewiesen werden kann (Barnhart, J. L. 1978; Hardison, W. G. M. and Wood, C. A. 1978).

II. Cholestase

II.1. Definition und Einteilung

Kliniker, Biochemiker und Morphologen sehen die Cholestase unter verschiedenen Gesichtspunkten. So steht für den Kliniker ein Ikterus, verbunden mit einer Stagnation des Galleflusses im Vordergrund, während für den Biochemiker die Veränderung der gallenpflichtigen Stoffe wie Bilirubin, Gallensäuren und Cholesterin in der Galle und die Erhöhung von Leberenzymen im Serum ausschlaggebend ist. Der Morphologe schließlich, stellt die morphologischen Veränderungen am Sekretionsapparat der Leber und an den Gallewegen voran.

Popper, H. und Schaffner, F. (1970) definieren die Cholestase als Stagnation des Galleflusses und unterscheiden je nach Ursache zwischen zwei Formen.

Der extrahepatischen Cholestase liegen immer mechanische Hindernisse in den galleableitenden Wegen zugrunde. Dies können entzündungsbedingte Strikturen, Tumore, Gallensteine u. a. sein. Die Verlegung der extrahepatischen Gallengänge bedingt dann die morphologischen Veränderungen an den proximal des Hindernisses gelegenen Gallengängen.

Die intrahepatischen Cholestasen sind ätiologisch viel schwieriger einzuordnen. Die Ursachen sind vielfältig und oft nicht geklärt. Auf jeden Fall ist das Sekretionsvermögen der Leberzelle gestört. Von dieser Alteration sind alle gallepflichtigen Bestandteile betroffen (Popper, H. 1978).

Nachfolgend wird eine kurze Übersicht der verschiedenen Entstehungsmöglichkeiten der intrahepatischen Cholestase gegeben:

1. pharmakabedingte Cholestase
2. Virushepatitis
3. rezidivierende schwangerschaftsbedingte Cholestase
4. Fettleber
5. Postoperative Nachwirkungen

In dieser Arbeit wird lediglich auf die pharmakainduzierte Cholestase eingegangen.

II.2. Morphologie der intrahepatischen Cholestase

Erste Veränderungen am Sekretionsapparat der Leber zeigen sich in der Dilatation der zentrolobulären Canaliculi, deren Lumen Gallethromben enthalten können. Im Zytoplasma und den Kupferschen Sternzellen befinden sich häufig Gallenpigmente. Durch eine Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums erscheint das Zytoplasma eosinophil (Schaffner, F. and Popper, H. 1979).

Mikrovilli, die normalerweise das kanalikuläre Lumen fast vollständig ausfüllen, erscheinen verkürzt, blasenförmig, geschwollen oder fehlen einfach. Lediglich die Mikrovilli um die Desmosomen bleiben lange Zeit intakt (Layden, T. J. 1975).

Bei der Lithocholsäurecholestase bilden sich bizarre,, lamellenähnliche Strukturen, die in das Lumen des Canaliculus hineinragen (Miyai, K. 1975).

Die Alterationen betreffen auch die Organellen des Hepatozyten. Das Golgifeld erscheint vergrößert und enthält opaque Granula. Die Proliferation des endoplasmatischen Retikulums führt zu Zerstörung seiner Membranstruktur, einhergehend mit einer Funktionsverminderung des Cytochrom P 450 (Schaffner, F. and Javitt, N. B. 1986).

II.3. Mögliche Mechanismen der intrahepatischen Cholestase,

Trotz intensiver Bemühungen ist es bisher nicht gelungen eine genaue Erklärung für den Mechanismus der intrahepatischen Cholestase zu geben. Dies liegt zum Teil an der relativ monotonen Symptomatik, die wenig aussagekräftig

ist, wie auch an den unvollkommenen Kenntnissen über den Sekretionsvorgang an der kanalikulären Membran.

II.3.1. Veränderungen am endoplasmatischen Retikulum

Verminderte Hydroxylierung von Gallensäuren im Hepatozyten, verursacht durch ein hypoaktives, hypertrophes, glattes endoplasmatisches Retikulum, waren nach einer Hypothese (Schaffner, F. and Popper, K. 1969) der ausschlaggebende Faktor in der Genese der Cholestase. Das Gleichgewicht bei der Biosynthese der Gallensäuren verschiebt sich, so daß cholestatisch wirkende Gallensäuren entstehen; die Aktivität von Cytochrom P 450 wird vermindert. Man ist jedoch, da man keine Erhöhung der Konzentration von Monohydroxygallensäuren messen konnte, von dieser Hypothese abgewichen und zur Ansicht gekommen, daß ein verändertes endoplasmatisches Retikulum die Folge und nicht die Ursache der Cholestase ist.

II.3.2. Kanalikuläre Präzipitate

Bei der taurolithochalatinduzierten Cholestase finden sich im Lumen der Canaliculi Gallenkonkremente (Bonvicini, F. 1978), die zum Teil aus Cholesterin bestehen. Ob die Ablagerungen Folge eines verringerten Wassergehaltes, bez. einer Flüssigkeitsabsorption oder einer Fragmentierung der kanalikulären Membran sind, läßt sich mit dem gegenwärtigen Wissensstand nicht beantworten. Zu erwähnen ist noch Chlorpromazin, das in vitro in H_2O mit Gallensäuren unlösliche Komplexe bildet, die jedoch durch Zugabe von Phospholipiden in Lösung gehalten werden (Carey, M. C. 1976).

II.3.3. Beeinflussung des Zytoskeletts des Hepatozyten

Verschiedene Autoren bringen eine Störung des Zytoskeletts in Zusammenhang mit der Verminderung der Gallensekretion. Cytochalasin B bewirkt sowohl eine Dilatation der Canalikuli mit Verlust der Mikrovilli (Phillips, M. J. 1975), wie auch eine Abtrennung der Mikrofilamente von der Plasmamembran (Oda, M. and Phillips, M. J. 1977).

An isolierten Hepatozyten wurde eine Beteiligung der kontraktilen Mikrofilamente und Mikrotubuli bei der Gallebildung nachgewiesen (Reichen, J. 1981).

Das zyklische Oktapeptid Phalloidin verändert das Gleichgewicht zwischen unpolymerisiertem G-Aktin und filamentösem F-Aktin und erhöht außerdem die Permeabilität der tight-junctions (Elias, E. 1980), ähnlich dem Chlorpromazin, das auf die Polymerisationseigenschaften von Aktin wirkt (Elias, E. 1979). Morphologisch auffällig ist eine Überproduktion von Filamenten in der perikanalikulären Region, begleitet von Mikrovilliverlust und kanalikulärer Dilatation.

II.3.4. Permeabilitätsänderung an den Gallewegen .

Erhöhte Permeabilität der galleableitenden Wege, verbunden mit einem Rückfluß von Galle, ist eine Möglichkeit, den Gallefluß zu reduzieren. Man hat mittels Clearancemessungen nachgewiesen, daß Steroidhormone (Forker, E. L. 1969), Tauroolithocholsäure (Layden, T. J. and Boyer, J. L. 1978) und Chlorpromazin (Strasberg, S. M. 1979) die Permeabilität der kanalikulären Membran und/oder tight junctions erhöhen. Da jedoch Tauroolithocholsäure die Viskosität der Membran durch Cholesterineinlagerung erhöht (Kakis, G. and Yousef, I. M. 1978), ist es zumindest fraglich, ob die kanalikuläre Membran wasserdurchlässiger wird, da erhöhte Viskosität gleichbedeutend ist mit einer Hemmung des Wassertransports (Cooper, R. A. 1978).

II.3.5. Beeinflussung von membranständigen Enzymsystemen der Leberzelle.

Verschiedentlich wird die Na-K-ATPase mit dem GSUGF in Zusammenhang gebracht. (Reichen, J. and Paumgartner, G. 1977). Da man lange Zeit vermutete, daß die Lokalisation des Enzyms die kanalikuläre Membran sei, wurde versucht, eine Korrelation zwischen verringertem Gallefluß und einer Aktivitätsabnahme des Enzyms nachzuweisen. So sind auch die in der Literatur beschriebenen Einflüsse von hepatotoxischen Pharmaka und Gallensäuren auf das Enzym widersprüchlicher Natur. In vitro Versuche mit Chlorpromazin an Leberplasmamembranen der Ratte verringern die Aktivität des Enzyms (Keefe, E. B. 1980). Der gleiche Effekt läßt sich auch mit allen Gallensäuren außer Dehydrocholsäure erzielen (Scharschmidt, B. F. 1981). Tavoloni, N. (1979) jedoch, gelang es nicht, mit Chlorpromazin an der isoliert perfundierten Rattenleber eine Schädigung des Enzyms nachzuweisen, wohingegen Ratten nach einer intravenösen Injektion von Lithocholsäure Cholestasesymptome zeigten (Kakis, G. and Yousef, I. M. 1978), die sich jedoch mit dem Taurinkonjugat nicht einstellten. Verabreicht man Taurolithocholsäure als Bolusinjektion, stellt man wiederum eine Beeinflussung des Enzyms fest (Reichen, J. and Paumgartner, G. 1979).

Äthinylöstradiol hemmt in vitro den GSUGF und parallel dazu die Na-K-ATPase-Aktivität (Keefe, E. B. 1979). 17- β -Östradiol ist in vivo ein potentes cholestatisches Pharmakon. In vitro Studien beweisen zusätzlich seine cholestatische Wirksamkeit, eine Hemmung von Membranenzymen jedoch, ist nicht nachweisbar (Adinolfi, L. E. 1984).

Obwohl einiges dafür spricht, daß die Na-K-ATPase am Sekretionsmechanismus der Galle beteiligt ist, scheint es unwahrscheinlich, daß die Aktivitätsverminderung des

Enzyms die Ursache des cholestatischen Geschehens ist.

Die Mg-ATPase befindet sich als integrales Protein in der kanalikulären Membran (Meier, P. J. 1984).

Mit in vitro Versuchen konnte eine Enzymhemmung durch Gallensäuren (Scharschmidt, B. F. 1981) und Chlorpromazin (Tavoloni, N. 1979) nachgewiesen werden. Versuche mit Äthinylöstradiol brachten widersprüchliche Ergebnisse zu Tage (Simon, F. R. 1973; Keefe, E. B. 1979).

Das Enzym wird auch mit dem Mikrofilamentsystem der Zelle in Zusammenhang gebracht. Cytochalasin B zerstört nicht nur das Mikrofilamentsystem der Zelle, sondern vermindert zusätzlich die Aktivität der Mg-ATPase (Oda, M. and Phillips, M. J. 1977).

II.3.6. Beeinflussung der Membranzusammensetzung der Leberzelle.

Die Sekretion von Gallensäuren ist ein wichtiger Faktor, der die biliäre Ausscheidung von Lipiden mitbestimmt. Die Herkunft der Phospholipide in der Galle und die Mechanismen, die die kanalikuläre Membran vor der Detergenswirkung der Gallensäuren schützen, sind nur teilweise bekannt. Eine Schutzwirkung besteht wahrscheinlich in der Membranzusammensetzung der Leberzelle. So weiß man, daß die kanalikuläre Membran einen hohen Sphingomyelingehalt besitzt und das Auslösen der Phospholipide aus der Membran ein zweiphasiger und selektiver Vorgang ist (Yousef, I. M. and Fisher, M. M. 1976). Außerdem sind Erythrozyten mit einem hohen Sphingomyelin-Phospholipid Verhältnis besser vor gallensäureninduzierter Hämolyse geschützt (Coleman, R. 1980).

Taurocholsäure erhöht den Phospholipidgehalt der Membran, während die nicht als Detergens wirkende Dehydrocholsäure die Membranzusammensetzung und Lipidsekretion nicht ändert

(Nemchausky, B. A. 1977). Der Phospholipidgehalt wird auch von Äthinylöstradiol (Keefe, E. B. 1979; Davis, R. A. 1978) und Lithocholsäure (Kakis, G. and Yousef, I. M. 1978) nicht verändert. Die Taurolithocholsäure hingegen erhöht in nichtkanalikulären Plasmamembranen den Phospholipidgehalt der Membran, während er in mit kanalikulären Membranteilen angereicherten Membransuspensionen gleich bleibt (Kakis, G. and Yousef, I. M. 1978).

Äthinylöstradiol erhöht den Cholesterinestergehalt von Leberplasmamembranen. Gleichzeitig steigt die Viskosität der Membran, während die Na-K-ATPase Aktivität gehemmt wird (Davis, R. A. 1978).

Lithocholsäure und das Taurinkonjugat erhöhen die Cholesterinkonzentration in der Membran um das Zwei- bez. Siebenfache. Gleichzeitig wird Lithocholsäure in die Membran eingelagert, die Taurolithocholsäure läßt sich jedoch nicht nachweisen (Kakis, G. and Yousef, I. M. 1978; Bonvivini, F. 1978). Diese Veränderung der Membranzusammensetzung hat sowohl auf die Permeabilität der Membran, wie auch auf die Aktivität von membrangebundenen Enzymen einen negativen Einfluß (Cooper, R. A. 1978; Kimelberg, H. K. and Paphadjopoulos, D. 1974).

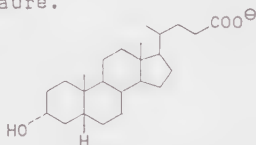
Über die Veränderung der Proteinfraktion der Leberzellmembran während der Cholestase ist bekannt, daß durch Bolusinjektion von Taurolithocholsäure der Proteingehalt der Membran abnimmt, bei kontinuierlicher Applikation keine Veränderung eintritt (Reichen, J. and Paumgartner, G. 1979; Kakis, G. and Yousef, I. M. 1978).

II.4. Cholestaseinduzierende Pharmaka.

Im folgenden Kapitel werden zwei Pharmaka und zwei Gallensäuren näher beschrieben, da sie trotz der Unterschiede in ihrem chemischen Aufbau z. T. ähnliche Wirkungen auf die Lipidmembran der Leber ausüben, bez. direkt mit der Membran wechselwirken. Diese Analogien betreffen die Veränderung der Membranzusammensetzung und die Fluidität der Membran, zwei wichtige Parameter, die die Eigenschaften von Membranen bestimmen. Zusätzlich wird der protektive Effekt von Mizellenbildnern (z. B. Taurocholsäure, Triton WR 1339) auf diese Cholestatika in der Literatur erwähnt. Da in der Arbeit auch diesem Problem ein Kapitel gewidmet ist, erscheint es gerechtfertigt, auf die Substanzen näher einzugehen.

II.4.1. Lithocholsäure.

Abb.2: Lithochol-
säure.



Diese Monohydroxygallensäure entsteht im Darm durch bakterielle Einwirkung aus Chenodeoxycholsäure. Durch Sulfatierung in der 3-OH Position wird die Absorption aus dem Intestinum wirksam unterbunden. Dieser Schritt, der die Wasserlöslichkeit des Moleküls erhöht, stellt einen Schutzmechanismus bei Mensch und Ratte dar (Palmer, R. H. 1971; Bonvicini, F. 1978). Gleichzeitig wird der renale Exkretionsweg gefördert, da die Sulfatierung eine Rückresorption in den Nierentubuli verhindert (Heaton, K. W. 1979). In vielen Spezies werden sekundäre Gallensäuren in der Leber rehydroxyliert. Die Ratte hydroxyliert die Lithocholsäure in der 6 β -Position mit einer sehr hohen Kapazität (Palmer, R. H. 1972).

Lithocholsäure verursacht eine Dilatation der Gallenkanälchen. Zu dem Verlust der Mikrovilli gesellt sich eine Verdickung des Ektoplasma (Miyai, K. 1971, 1975, 1977). In einem späteren Stadium bilden sich seltsame lamelläre Strukturen, die das Lumen des Canaliculus verengen.

(Miyai, K. 1975). Zusätzlich entstehen starke Verdichtungen am Mikrofilamentsystem, die wiederum hauptsächlich am „junctional complex“ vorkommen und vermuten lassen, daß die Lithocholsäure auch die aktinhaltigen Filamentsysteme beeinflußt.

Zusätzlich verursacht sie eine Zunahme der Lysosomen, eine Dilatation des Golgfeldes und eine Zerreißung des rauen und eine Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums (Schaffner, F., Javitt, N. B. 1966).

Bei der lithocholsäureinduzierten Cholestase werden neben der Gallensäure noch große Mengen Cholesterin in die Membran eingelagert (Kakis, G., and Yousef, I. M. 1978), während der Phospholipidgehalt gleich bleibt. Daraus resultieren möglicherweise Veränderungen der Membranviskosität, wie sie an Erythrozyten mit einer Erhöhung des Cholesterinanteils in der Membran gefunden wurden (Cooper, A. C. 1978). Dadurch sollen sich zusätzlich die Permeabilität und der Wassertransport durch die Membran ändern.

Eine andere These, die auf Clearancemessungen beruht, sagt aus, daß zwar der Gallefluß reduziert ist, die Permeabilität der Membran erhöht zu sein scheint. Dadurch kommt es zu einem verstärkten Rückfluß von Galle und zur Verstärkung der intrahepatischen Cholestase (Forker, E. L. 1977).

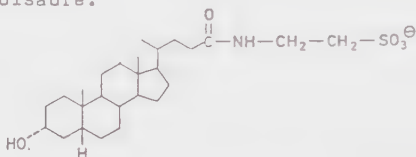
Neueste Untersuchungen an der Ratte brachten zutage, daß Lithocholsäure die Neusynthese von Cholesterin in Mikrosomen erhöht. Beide Komponenten werden gemeinsam zur Membran transportiert. Selbst ohne de novo Synthese überträgt Lithocholsäure Cholesterin von den Mikrosomen auf die kanalikuläre Membran (Yousef, I. M. 1984a; 1984b). In vitro Versuche zeigen, daß Lithocholsäure notwendig ist, um Cholesterin an kanalikuläre Membranen zu binden. Cholsäure reduziert aber offensichtlich den Lithocholsäuregehalt der Membran, wenn sie gleichzeitig mit den beiden anderen Komponenten vorhanden ist. Der Cholesteringehalt der Membran bleibt konstant.

Simultane Infusionen von Chol-Taurocholsäure mit Litho-Tauro-lithocholsäure verhindern bei der Ratte die Ausbildung der cholestatischen Symptome (Miyai, K. 1977; Kakis, G. 1980, Layden, T. J. 1977).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Lithocholsäure die makromolekulare Organisation der kanalikulären Lipidmembran stört. Die Beeinflussung von membranständigen Enzymsystemen ist damit möglicherweise nicht die Ursache, sondern die Folge der Cholestase.

II.4.2. Tauroolithocholsäure.

Abb.3: Tauroolithocholsäure



Tauroolithocholsäure, die konjugierte Form der Lithocholsäure, verursacht eine dosisabhängige, reversible Cholestase. Sie beeinflußt sowohl die Gallensäuresekretion wie auch den gallensäurenunabhängigen Gallenfluß (Javitt, N. B. and Emerman, S. 1968; King, J. E. and Schoenfield, L. J. 1971). Die morphologischen Veränderungen beinhalten den Verlust der Mikrovilli, eine Dilatation der Canaliculi, Zerreißen der kanalikulären Membran und in einem späteren Stadium eine lamelläre Umformung der Membran (Layden, T. J. and Boyer, J. L. 1977; Kakis, G. and Yousef, I. M. 1978). In den Canaliculi finden sich amorphe Massen, die zytochemisch als Cholesterin bestimmt worden sind (Bonvicini, F. 1978).

Verabreicht man Ratten Tauroolithocholsäure in Form von einer Bolusinjektion, vermindert sich die Aktivität der Na-K-ATPase (Reichen, J. and Paumgartner, G. 1979), während eine kontinuierliche Infusion der Gallensäure keinen Effekt auf das Enzym hat (Kakis, G. and Yousef, I. M. 1978). Der Gallefluß wird jedoch in beiden Fällen gehemmt. Tauroolithocholsäure wird nicht in die Membran integriert, er-

hört aber den Cholesteringehalt der kanalikulären Membran um das Zweifache, der Phospholipidgehalt der Membran bleibt unverändert. (Kakis, G. and Yousef, I. M. 1978). Die durch Tauroolithocholsäure entstehenden Schäden lassen sich durch gleichzeitige Applikation von Cholsäure (Kakis, G. and Yousef, I. M. 1980) oder Taurocholsäure (Javitt, N. B. and Emerman, S. 1968) vermeiden. Es wird angenommen, daß die verschiedenen Gallensäuren Komplexe bilden und dadurch die Toxizität von Taurocholsäure herabgesetzt wird.

II.4.3. Chlorpromazin.

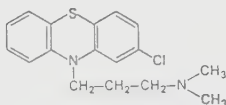


Abb.4: Chlorpromazin

Chlorpromazin, (2-Chlor-10-(3-dimethylaminopropyl)-phenothiazinhydrochlorid hat bekannte Nebenwirkungen wie z. B. Erhöhung der alkalischen Phosphatase (Hargreaves, T. 1965), im Serum; Verminderung der Bilirubinausscheidung oder auch cholestatische Gelbsucht bei rund 1% der behandelten Patienten (Ishak, K. G. and Irey, N. S. 1972). Früher wurden diese Symptome einer Hypersensitivitätsreaktion zugeschrieben, (Popper, H. and Schaffner, F. 1959), jedoch ist man inzwischen von dieser Interpretation abgekommen und betrachtet das Geschehen mehr als Folge einer direkten Interferenz des Chlorpromazin mit der kanalikulären Membran.

Das Pharmakon verteilt sich gut in allen Körpergeweben und wird intensiv metabolisiert. Bisher sind rund 75 Stoffwechselprodukte in Plasma, Urin und Faeces von behandelten Patienten gefunden worden (Turano, P. and Turner, W. 1973). Größtenteils erfolgt der Abbau über Hydroxylierung in der 3- und 7-Position mit anschließender Glucuronidierung. Eine weitere Möglichkeit der Elimination, die zu je 50% über

Urin und Faeces erfolgt, besteht in der Bildung von nicht hepatotoxischen Sulfoxiden.

Chlorpromazin ist bei einem pH von kleiner als 7,4 ein wasserlösliches, kationisches Molekül. In wässrigem Medium bildet es in vitro mit Phosphatidylserin und Gallensäuren oberhalb ihrer kritischen Mizellaren Konzentration unlösliche 1:1 Komplexe, die aus der Lösung ausfallen (Carey, M. C. 1976)

Die morphologischen Auswirkungen einer Behandlung mit Chlorpromazin bestehen in der Ausbildung von zytoplasmatischen Vakuolen und Myeloidkörpern, Blasenbildung an der sinusoidalen Membran und der Entstehung von Divertikeln an der kanalikulären Membran (Hruban, Z. 1978).

In vivo verringert Chlorpromazin die Gallesekretion beim Hund (Sharma, J. N. and Prasad, C. R. 1967) und Rhesusaffen (Ros, E. 1979). Parallel dazu stagniert die Ausscheidung von Cholesterin und Phospholipiden.

In der isolierten, perfundierten Rattenleber hemmt Chlorpromazin die Aktivität der Mg-ATPase und der 5'Nucleotidase, während die Na-K-ATPase nicht alteriert wird (Tavoloni, N. 1979). Im Gegensatz dazu hemmt das Mittel und verschiedene seiner Metaboliten, in mit kanalikulären Membranen angereicherten Leberplasmamembranen die Aktivität der Na-K-ATPase und Mg-ATPase, während die 5'Nucleotidase unbeeinflusst bleibt (Samuels, A. M. and Carey, M. C. 1978).

Die Aktivitätshemmung der Enzyme geschieht unmittelbar, ist dosisabhängig und reversibel.

Mit Fluoreszenzmessungen konnte auch eine Erhöhung der Viskosität von Leberplasmamembranen nachgewiesen werden. Diese Fluiditätserniedrigung ist eng mit der Fähigkeit von Chlorpromazin verbunden membranständige Enzyme der Leber zu beeinträchtigen (Keefe, E. B. 1980).

Chlorpromazin interferiert auch mit dem Stützskelett der Leberzelle. Es beeinflusst in vitro die Fähigkeit von Aktin, einer filamentösen Komponente des Skeletts, zu polymerisieren und sich in die Gelform umzulagern, zwei Eigen-

schaften, die für die Funktion des Stützskeletts unerläßlich sind (Elias, E. and Boyer, J. L. 1979). Die funktionellen Änderungen, denen dieses Protein unterworfen ist, sind eng verknüpft mit der Aktivierung der Mg-ATPase, die ebenfalls in ihrer Funktion beeinträchtigt wird.

Diese Ergebnisse scheinen darauf hinzuweisen, daß Chlorpromazin mit der Plasmamembran der Leberzelle und zytoplasmatischen Komponenten wechselwirkt und die cholestatischen Symptome das Resultat dieses Geschehens sind.

II.4.4. Steroidhormone.

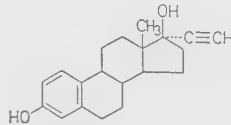


Abb.5: Äthinylöstradiol

Östrogene werden bei Mensch und Ratte dem enterohepatischen Kreislauf unterzogen und vor allem über die Faeces ausgeschieden (Kreek, M. J. 1969). Wichtig für den Einfluß des Hormons auf die Leberfunktion beim Menschen scheint die phenolartige A-Ringstruktur und ein 17 α -alkylsubstituiertes C-Atom zu sein (Perez, V. and Gorodisch, S. 1974).

Östrogene und Äthinylöstradiol erhöhen die Permeabilität der galleabführenden Wege. Die veränderte Permeabilität kann durch Bestimmung der Clearancerate von hochmolekularen Substanzen nachgewiesen werden (Forker, E. L. 1969; Petersen, R. E. and Fujimoto, J. M. 1977).

Der durch Äthinylöstradiol bedingte Rückgang der Gallesekretion (Gumucio, J. L. and Valdivieso, V. D. 1971; Davis, R. A. 1978) ist verbunden mit einer gleichzeitigen Verminderung der Aktivität der Na-K-ATPase (Reichen, J. and Paumgartner, G. 1977). Die Auswirkungen auf die Mg-ATPase sind widersprüchlich (Simon, F. R. 1980). In die Membran werden große Mengen von Cholesterinester eingelagert,

während der Phospholipidgehalt der Membran konstant bleibt (Davis, R. A. 1978). Die Veränderung der Membranzusammensetzung beeinflusst auch die Membranfluidität. Diese Veränderungen lassen sich mit Triton WR 1339, einem Mizellenbildner, rückgängig machen (Simon, F. R. 1980).

Füttert man Ratten mit einer speziellen Diät, die über Enzymaktivierung auf die Fluidität der Membran einen Einfluß hat, so erhöht sich sowohl bei Kontrolltieren, wie auch den cholestatistischen Tieren (durch Äthinylöstradiol induziert) die Fluidität der Membran. Diese Fluiditätserhöhung geht mit einer Erhöhung des Galleflusses einher. Gleichzeitig senkt sich das Cholesterinester-Phospholipid-Verhältnis (Storch, J. and Schachter, D. 1983).

II.5. Konsequenzen der Cholestase.

Die Retention von Gallensäuren führt zu deren Konzentrationsanstieg im Serum mit der Folge einer Einschränkung der Neusynthese derselben. Pruritis, ein lediglich beim Menschen zu beobachtendes Symptom, wird den Ablagerungen von Gallensäuren in der Haut zugeschrieben. Das Auftauchen von atypischen Gallensäuren im Serum (Glucuronide und Sulfate) kann, da diese Verbindungen gut über die Niere ausscheidbar sind, als Entgiftungsmechanismus des Körpers angesehen werden.

Die Anhäufung von Gallensäuren und Bilirubin im Hepatozyten verursacht schwere Stoffwechselschäden in der Leber. Bilirubin erniedrigt die Sauerstoffaufnahme durch Mitochondrien und entkoppelt zusammen mit den Gallensäuren die oxidative Phosphorylierung mit dem Ergebnis einer Einschränkung der Energieversorgung der Zelle.

Verschiedene Gallensäuren verändern die Form der Cristae mitochondriales und mindern dadurch ihre Funktionsfähigkeit. Durch die Bindung der Gallensäuren an das endoplasmatische Retikulum wird die Biotransformation von Drogen unterbunden. Die Detergenseigenschaften der sich anhäufenden Gallensäuren bewirken das Auslösen von Phospholipiden aus der Hepatozytenmembran (Yousef, I. M. 1975).

Myelinartige Strukturen, die sich im Zytoplasma nachweisen lassen, sind das Ergebnis der Akkumulation von freien Gallensäuren. Das Bild der federigen Degeneration, gleichbedeutend mit Schwund von Zytoplasma, tritt oft gleichzeitig mit der Proliferation des endoplasmatischen Retikulums in Erscheinung. Infolge dieser Veränderungen beginnen die Ductuli ungerichtet zu sprossen, ein Vorgang, der sich als portale Entzündung darstellt und sich bis zur periportalen Fibrose weiterentwickeln kann. Die Konsequenz dieses Geschehens ist eine zusätzliche mechanische Behinderung des Galleflusses (Schaffner, F. and Popper, H. 1979).

II.6. Folgerungen

Aus den Versuchen, die mit cholestatisch wirksamen Mitteln durchgeführt wurden, geht hervor, daß diese zwar den Gallenfluß hemmen, aber die Sekretion der Galle, möglicherweise abhängig von der Versuchsanordnung, nicht im befriedigenden Maße mit der mehr oder minder feststellbaren Beeinflussung von membranständigen Enzymsystemen korreliert. Es ist bisher auch nicht gelungen, die Rolle der Enzymsysteme bei der Gallensekretion genau zu definieren.

Hingegen sprechen einige Argumente für eine gegenseitige Beeinflussung von verschiedenen Cholestatika und der kanalikulären Membran. Zu nennen sind die Erhöhung von Cholesterin und Cholesterinester in der Membran, und die Einlagerung von Fremdmolekülen (Lithocholsäure). Viskositätsmessungen untermauern die These, daß die kompositionelle Abweichung der Leberzellmembran von der Norm ein grundlegender Schritt in der Entstehung der Cholestase sein könnte. Da die Funktionalität von membranständigen Enzymen von der sie umgebenden Lipidmatrix abhängig ist und diese Matrix offensichtlich verändert wird, scheint es möglich, daß die verschiedentlich beschriebenen Aktivitätsänderungen der Enzyme die Folge und nicht Teil der cholestatischen Anfangsergebnisse sind.

III. Membranen.

Im Kapitel Cholestase wurden einige Möglichkeiten umrissen, die dieses Krankheitsbild hervorrufen können. Dabei kristallisierte sich heraus, daß die beschriebenen Pharmaka mit der Leberzellmembran interagieren und deren Eigenschaften beeinflussen. Zum besseren Verständnis der Problematik wird ein kurzer Überblick über den Aufbau und die Eigenschaften biologischer und künstlicher Membranen gegeben.

III.1. Biologische Membranen.

Biomembranen erfüllen eine große Anzahl von verschiedenen Funktionen wie Sekretion, Transport, Endozytose und Signalübermittlung. Dabei vermitteln vermutlich komplexe Strukturen die Möglichkeit, spezifische Funktionen auszuüben (Lee, A. G. 1975).

Singer, S. J. und Nicolson, G. L. (1972) beschrieben in ihrem Flüssig-Mosaik-Modell die Biomembran als flexible, flüssig-kristalline Lipidschicht, in der Proteine und Cholesterinmoleküle relativ frei „schwimmen“. Neben den Proteinen und Lipiden können weitere Komponenten der Membran, wie verschiedenartige Kohlenhydrate vorkommen, die aber mengenmäßig nicht ins Gewicht fallen.

Lipide bilden das strukturelle Grundgerüst der Biomembran. Die Anordnung als Doppelmembran vereint hydrophile und amphiphile Eigenschaften miteinander. Die Lipide werden in die drei Kategorien Phospholipide, neutrale lipide und Glycolipide eingeteilt.

Die kanalikuläre Membran hat gegenüber der basolateralen und sinusoidalen Membran einen höheren Cholesteringehalt (0,45 mg/mg Protein bez. 0,19 mg/mg Protein), gleichermaßen ist der Phospholipidgehalt rund doppelt so hoch (Phospholipide 0,65 mg/mg Protein bez. 0,39 mg/mg Protein). Die drei Phospholipide Phosphatidylcholin (39%), Sphingomyelin (24%) und Phosphatidylethanolamin (25%) stellen insgesamt rund 88% der gesamten Phospholipidfraktion der kanalikulären Membran (Meier, P. J. 1984).

Eine besonders wichtige Eigenschaft der Membran, die Fluidität oder allgemeiner, die Bewegungsfreiheit der Lipidmoleküle, ist abhängig unter anderem von der Zusammensetzung des Lipidteils der Membran. Es ist offensichtlich, daß die Lipidumgebung der membrangebundenen Enzymsysteme diese in ihrer Aktivität beeinflusst (Grisham, C. M. and Barnett, R. E. 1972; Brasitus, T. A. and Schachter, D. 1980; Kimelberg, H. K. and Papahadjopoulos, D. 1974).

Auch für Transportprozesse ist die Fluidität ein wichtiger Faktor (Papahadjopoulos, D. 1973; Livingstone, C. J. and Schachter, D. 1980; Brasitus, T. A. 1979).

Der Begriff Fluidität kann in Zusammenhang mit der Biomembran beschrieben werden als Summe der Bewegungen die Lipide ausführen können und als da sind: Laterale Diffusion in der Ebene der Membran, Rotation um die eigene Achse und transversale Diffusion (Schachter, D. 1984).

Der Einfluß verschiedener Membrankomponenten auf die Fluidität ist dokumentiert, hauptsächlich allerdings durch Versuche mit künstlichen Membranen. So weiß man, daß Cholesterin die Fluidität von Phospholipidmembranen oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur erniedrigt (Shinitzky, M. and Barenholz, Y. 1978; Hubbell, W. L. and McConnell, H. M. 1971).

Ähnliche Versuche wurden an Erythrozytenmembranen durchgeführt (Cooper, R. A. 1977; Borochoy, H. 1979). Dabei kam man zu der Schlußfolgerung, daß der Phospholipid/Cholesterin-Quotient mit der Fluidität korreliert. Der Sättigungsgrad der verschiedenen Fettsäuren der Phospholipide und ihre Länge sind ebenfalls Parameter der Fluidität. Die Größe und Form der Phospholipid-Kopfgruppen bestimmt zusätzlich die Eigenschaften der Membran (Shinitzky, M. and Henkart, P. 1979; Hauser, H. and Phillips, M. C. 1979). In Bezug auf die Leberzellmembran wird berichtet, daß die kanalikuläre Fraktion visköser ist als die restliche Membran, was wohl damit zusammenhängt, daß der Cholesteringehalt in diesem Teil der Membran höher ist.

Bei den Membranproteinen unterscheidet man zwischen integralen Proteinen, die die Doppelmembran in ihrem ganzen Umfang durchstoßen und den peripheren Proteinen, die nur teilweise in die Membran eingelagert sind. Leberzellen besitzen zum Beispiel über hundert verschiedene periphere Proteine und Glycoproteine (Lee, A. G. 1975). Diese sind über kovalente Bindungen oder elektrostatische Kräfte mit den Lipiden verbunden. Proteine, die in die Membran ein- bez. sie durchdringen, sind so orientiert, daß ihr hydrophiler Teil außerhalb der Zelle lokalisiert und der apolare Teil mit der Lipidschicht verbunden ist. Durch diesen Aufbau ist eine Asymmetrie vorgegeben, die funktionellen Ansprüchen genügt.

Stimuliert man in in vitro-Versuchen endogene Proteine der Membran mit Kalzium, so kann man die Lipidzusammensetzung der Membran ändern und die Viskosität derselben erhöhen (Livingstone, C. J. and Schachter, D. 1980).

In Modellmembranen wird die Enthalpie des thermotropen Phasenübergangs der Lipide durch den Einschluß von Polypeptiden in die Membran verringert (Lee, A. G. 1977). Ähnliche Effekte von Lipid-Protein-Wechselwirkungen wurden in Leberzellmembranen beobachtet (Livingstone, C. J. and Schachter, D. 1980).

III.2. Künstliche Membranen.

Da im Rahmen dieser Arbeit auch mit künstlichen Membranen gearbeitet wird, speziell mit Liposomen aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPL), wird grundsätzlich über ihre Struktur und Eigenschaften rekapituliert.

Dipalmitoylphosphatidylcholin wurde gewählt, da es sich in vielen vorangegangenen Arbeiten anderer Autoren bewährt hat, und es außerdem in der Lebermembran die gewichtigste Phospholipidfraktion stellt (Jürgens, E. and Höhne, G. 1983).

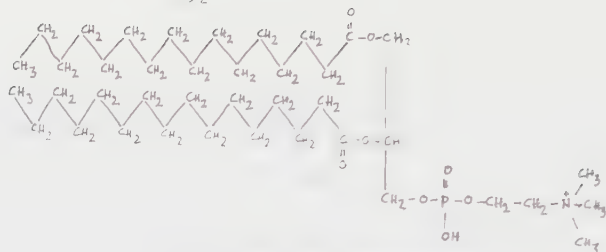


Abb.19:

Strukturformel von Dipalmitoylphosphatidylcholin

Dispersionen von Phospholipiden bilden in H_2O spontan aus energetischen Gründen Lipiddoppelschichten, die sich zu sphärischen Gebilden zusammenlagern. Diese multilamellären Strukturen (Liposomen) lassen sich durch Ultraschallbehandlung zu unilamellären Vesikeln mit einem mittleren Durchmesser von 30-50 nm umformen (Luzzati, V. 1968). Die Doppelschichten einheitlicher Lipidzusammensetzung zeigen einen endothermen Phasenübergang kristallin zu flüssig-kristallin, der dem Übergang smektisch B zu smektisch C thermotroper, flüssiger Kristalle entspricht (Sackmann, E. 1977).

Abhängig von der Struktur der Fettsäureketten und der polaren Kopfgruppe der Lipide verändert sich die Umwandlungstemperatur T_U (Ladbrooke, B. D. and Chapman, D. 1969; Hinz, H. J. and Sturtevant, J. M. 1972).

Die einige $^{\circ}C$ früher eintretende Vorphasenumwandlung wird dem Einfluß der polaren Kopfgruppen zugeschrieben (Lee, A. G. 1974). Folgende Daten charakterisieren die Struktur von Dipalmitoyllecithin-Doppelmembranen:

Unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur sind die Fettsäureketten in Form eines Dreiecksgitters angeordnet, wobei die einzelnen Ketten einen Abstand von ca. 0,49 nm haben. Die Lipidschicht hat eine Dicke von ungefähr 4,6 nm. Die Längsachsen sind dabei um rund 30° gegenüber der Senkrechten geneigt (Levine, Y. K. 1973).

Oberhalb der T_U nimmt die Membrandicke um etwa 0,5 nm zu. Der Kettenabstand erhöht sich auf ca. 0,53 nm und die relative Volumenänderung dV/V beträgt rund 1% (Melchior, D. L.

and Morowitz, H. J. 1972).

Mit der Phasenumwandlung verändert sich auch die räumliche Anordnung der Fettsäure-Ketten. Die Versetzungen innerhalb der Paraffinketten entstehen durch trans-gauche Übergänge der CH_2 -Gruppen und führen die Ketten von der gestreckten all-trans Form des kristallinen Membranzustandes in die gewinkelte Konfiguration der flüssig-kristallinen Phase über (Lippert, J. L. and Peticolas, W. L. 1972).

Durch die räumliche Veränderung einzelner Paraffinketten entstehen Hohlräume im Kettenverband, die zu einer Verringerung der Kooperativität der Ketten führt (Marsh, D. 1977).

Die Strukturdefekte bez. Kinken sind nicht lokalisiert, sondern bewegen sich mit äußerster Schnelligkeit entlang der Kettenrichtung. Durch die Beweglichkeit der Kinken erhöht sich die Fluidität der Membran enorm (Lee, A. G. 1974).

Allerdings ist die Beweglichkeit der Fettsäureketten im Zentrum der Membran am größten. Versuche mit Spin-Labels erbrachten, daß die Kette bis zum 8. C-Atom sich in der trans-Stellung befindet, darüberhinaus sich aber die Möglichkeit einer nicht-trans-Stellung der Kette rapide erhöht (Hubbell, W. L. and Mc Connell, H. M. 1971).

IV. Pharmaka und Reagentien.

Substanzen	Abk.	Hersteller
Chlorpromazinhydrochlorid	CPZ	Sigma
Cholesterin	Chol	Serva
Dipalmitoylphosphatidyl- cholin	DPL	Fluka
Fettsäure-Label 12,3	12,3	Syva
Hydroxysteroiddehydro- genase		Sigma
Lithocholsäure-Natrium- salz	Na-LC	Sigma
NAD-Diaphorase		Sigma
Resazurin		Serva
Taurocholsäure-Natrium- salz	Na-TC	Sigma
Tempo-Label	Tempo	Syva
TRIS(Hydroxymethylamino- methan)-Puffer	TRIS	Sigma

Alle Präparate waren analysenrein.

Der in den Versuchen verwendete Puffer setzte sich zusammen aus 50 mmol/l TRIS und 100 mmol/l NaCl, Gesamtkonzentration 150 mmol/l. Der pH-Wert des Puffers betrug 7,2. Für den 3. Teil der Versuche wurde die Pufferkonzentration mit Aqua dest. auf 10 mmol/l verringert.

V. Methoden.

V.1. Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Das Prinzip besteht in der selektiven Absorption elektromagnetischer Strahlung in paramagnetischen Substanzen (freie Radikale, Übergangsmetalle und Spin Label). Nachgewiesen werden dabei lediglich ungepaarte Elektronen, bez. die Wechselwirkung mit ihrer Umgebung.

Die Methode findet Anwendung an biologischen Molekülen zum Nachweis von:

1. Konformationsänderungen an Proteinen
2. Redoxveränderungen in Elektronentransferketten
3. Struktur und Reaktivität von Enzymzwischenprodukten
4. Fluiditätsveränderungen in Membranen

Atome, Moleküle und Ionen besitzen neben ihrem mechanischen Drehimpuls noch ein magnetisches Moment, das sich aus Bahn-umlauf und der Eigenrotation des Elektrons zusammensetzt. Dieses Moment wird magnetisches Spinnmoment genannt und entspricht einem kleinen Dipol. Setzt man Dipole einem äußeren Magnetfeld aus, so orientieren sie sich entsprechend ihren Polen. Das ungepaarte Elektron vollführt dabei Präzessionsbewegungen um die Referenzachse. Die potentielle Energie eines magnetischen Dipols ist abhängig von seiner Ausrichtung in Bezug auf das Magnetfeld

$$E_{\text{pot}} = -\vec{\mu} \cdot \vec{H}$$

μ = magnetisches Moment
(Tesla)

H = Magnetfeld

Der Spin, bez. das magnetische Moment nehmen nach quantenmechanischen Gesetzen nur bestimmte Orientierungen in einem äußeren Magnetfeld, abhängig von den magnetischen Quantenzahlen, m und s ein, d. h. es sind nur ganz bestimmte Einstellungen zum Magnetfeld möglich. So sind bei einem Elektron ($m, s = 1/2$) nur zwei Einstellungen erlaubt und zwar parallel und antiparallel zur H_0 Richtung.

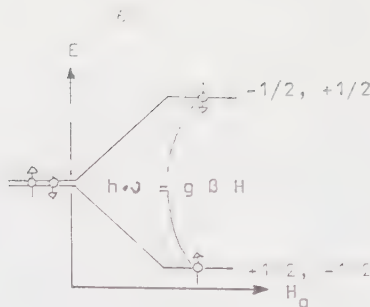


Abb.6:

In der Abbildung ist angedeutet, daß ohne angelegtes Magnetfeld die Spineinstellungen gleiche Energien haben. Ein angelegtes Magnetfeld bewirkt, daß die parallele Einstellung energieärmer, die antiparallele energiereicher wird.

Die Energieniveaus der Spineinstellungen in einem Magnetfeld lassen sich wie folgt beschreiben.

$$E_{2/1} = g \cdot \mu_B \cdot H \cdot S = \pm \frac{1}{2} g \cdot \mu_B \cdot H$$

g = Landé-Faktor
 μ_B = Bohrsches Magneton (erg/Tesla)
 H = magnetische Feldstärke (Tesla)

Jede Form der Absorptionsspektroskopie beruht auf der Tatsache, daß Absorption der Strahlung durch ein Molekül einen Übergang des Elektrons vom stabilen in den angeregten Zustand induziert. Die absorbierte Energie E entspricht der Energiedifferenz zwischen den Zuständen.

$$E = h \cdot \nu = E_2 - E_1$$

h = Plancksches Wirkungsquantum (J sec)

ν = Frequenz der Strahlung (1/sec)

Daraus ergibt sich zwanglos die Resonanzbedingung:

$$E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot H$$

Befinden sich die Spins im thermischen Gleichgewicht, so sind mehr Spins auf dem für sie energetisch günstigeren, niederen Niveau.

Das Verhältnis der Besetzungszahlen n_1 und n_2 gibt die Boltzmannstatistik wieder.

$$\frac{n_2}{n_1} = e^{-\frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{k \cdot T}}$$

k = Boltzmann-Konstante
(erg/grad)

T = absolute Temperatur
(°K)

Damit keine Sättigung eintritt, muß durch Relaxationsmechanismen dafür gesorgt werden, daß ein stationäres Gleichgewicht erhalten bleibt. Die Energie wird strahlenlos als kinetische Energie an die Umgebung des gesamten Kristallgitters abgegeben. In Flüssigkeiten wird sie über Brownsche Molekularbewegung abgeleitet. Man nennt diesen Prozeß Spin-Gitter-Relaxation.

V.1.1. Hyperfeinstruktur

Atomkerne besitzen ein magnetisches Moment, wenn ihre Kernspinquantenzahl ungleich Null ist ($I \neq 0$).

Hyperfeinstrukturen treten auf, wenn in Nähe des radikalischen Elektrons sich Kerne mit magnetischen Momenten befinden. In einem starken Magnetfeld orientieren sich die Elektronen- und Kernspins unabhängig voneinander. Die Projektion der Elektronenspinmomente auf das äußere Magnetfeld sind aber abhängig von den Kernmomenten, bez. der Kernspinquantenzahl m_I .

Durch die Wechselwirkung mit den Kernspinmomenten spalten sich die Energieniveaus des Elektronenspins auf und die Resonanzbedingung erweitert sich zu :

$$h\nu = g \cdot \beta \cdot H + \sum a_i I_i$$

a_i = Hf-Aufspaltungsparameter

I_i = Kernspinquantenzahl

Da auch der Kernspin quantenmechanischen Regeln unterworfen ist, gilt als Auswahlregel, daß sich die magnetische Quantenzahl des Elektrons um $m_s = 1$ ändert, während die

Kernspinquantenzahl unverändert bleibt. Es sind also nur Übergänge zwischen Niveaus gleicher Kernspinquantenzahl möglich. Eine von einem Elektronenspinübergang hervorgerufene Linie spaltet sich in $(2I + 1)$ Hyperfeinstrukturlinien auf. Die Linien sind symmetrisch um die Stelle gruppiert, an der die Elektronenspinresonanzabsorption ohne Hyperfeinstruktur als Einzellinie auftreten würde. Die Größe der Aufspaltung ist ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung. Die Intensität der einzelnen Komponenten werden durch die Besetzungsmöglichkeiten der einzelnen Niveaus bestimmt.

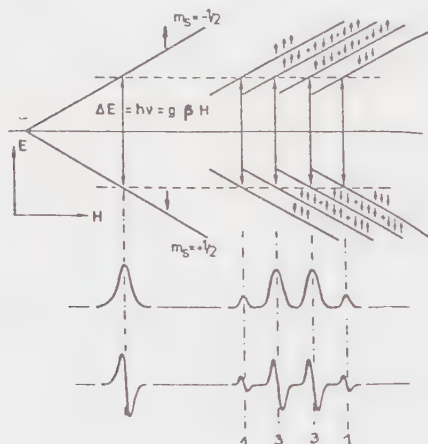


Abb.7:

Aufspaltung der Energieniveaus eines Radikalelektrons im Magnetfeld. Links ohne Hyperfeinstruktur, rechts bei Wechselwirkung mit drei äquivalenten Kernspins ($I = 1/2$). Die Kurven darunter stellen die Absorptionskurve sowie deren erste Ableitung dar.

V.1.2. g-Wert

Die absolute Position der Linien eines Elektronenspin-resonanzspektrums in einem Magnetfeld wird durch seinen g-Wert charakterisiert. In freien Radikalen ist das Elektron oft über das ganze Molekül delokalisiert und verhält sich ähnlich einem völlig freien Elektron. (theoretischer g-Wert = 2,0023).

Abweichungen von diesem Wert geben Mitteilung über den Grad der orbitalen Aufenthaltsbeschränkung des Elektrons. In Spin-Labeln (Nitroxyl-Radikale) sind die ungepaarten Elektronen hauptsächlich im p π -Orbital des Stickstoff-atoms lokalisiert.

V.1.3. Isotrope Hyperfeinstrukturaufspaltung

Freie Radikale erzeugen aufgrund ihrer völlig freien Beweglichkeit in Flüssigkeiten charakteristische Spektren.



Abb.8:

Isotropes Spektrum von Tempo in H₂O

Dadurch werden alle anisotropen Anteile von a und g ausgemittelt und das Spektrum erscheint symmetrisch. Neben der Wechselwirkung des Elektrons mit dem Stickstoffkern, gekennzeichnet durch die drei großen Picks, erkennt man noch die Beeinflussung durch einen C₁₃ Kern, sichtbar an den kleinen Picks.

V.1.4. Anisotrope Hyperfeinstrukturaufspaltung

Die Anisotropie ist sehr wichtig für die Beurteilung von Spin-Label-Spektren, da sich direkt Aussagen über die Lage und Beweglichkeit des Spin-Labels machen lassen.

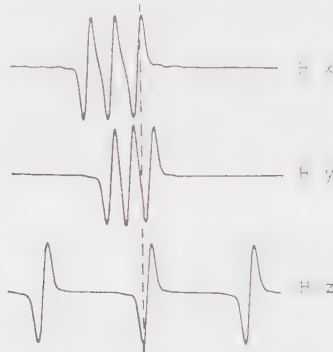


Abb.9:

$$g = 2,0036$$

Spektrale Anisotropie eines in einem Einkristall eingelagerten Nitroxyl-Spin-Labels. Das Magnetfeld ist jeweils nach den Hauptachsen des N-O-Radikals ausgerichtet.

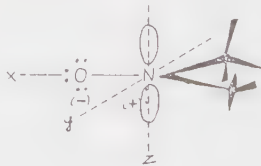


Abb.10:

$p\pi$ -Orbital des Nitroxyl-Radikals

Das ungepaarte Elektron befindet sich hauptsächlich im $p\pi$ -Orbital des Stickstoffatoms. Die Anisotropie der Spektren der drei Hauptrichtungen läßt sich durch die Hyperfeinstrukturaufspaltung und die Position des g -Wertes erkennen. Die entsprechenden g -Werte sind: $g_{zz} = 2,0027$, $g_{xx} = 2,0089$, $g_{yy} = 2,0061$

Die Hyperfeinstrukturkonstanten, entsprechend den Hauptachsen, sind: $A_{zz} = 32 \text{ G}$, $A_{xx} = 6 \text{ G}$, $A_{yy} = 6 \text{ G}$

Für Einstellungen zwischen den Hauptrichtungen ergeben sich Werte, die vom Winkel zwischen dem Magnetfeld und den Hauptrichtungen abhängig sind. Mißt man eine Probe, ohne das Magnetfeld auf die Hauptrichtungen auszurichten, so erhält man eine Superposition von Spektren.



Abb.11:

Dargestellt ist das Spektrum eines Nitroxyl-Spin-Labels, eingelagert in eine Lipidsuspension.

Der Label zeigt eine begrenzte axiale Beweglichkeit, die die Aufspaltungen zum Teil ausmittelt. Bei axialer Symmetrie gilt: $A_{||} = A_{zz}$, $A_{\perp} = A_{xx} = A_{yy}$; und entsprechend für die g-Werte: $g_{||} = g_{zz}$, $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$

Deshalb ist $A_{||}$ kleiner als A_{zz} und $A_{\perp}$ größer als A_{xx} und A_{yy} .

Literaturauswahl:

Berliner, L. J. 1975

Scheffler, K. und Stegmann, H. B. 1970

Schoffa, G. 1964

V.2. Spin-Label.

Spin-Label sind synthetische, organische, freie Radikale (Mc Connell, H. M. and Mc Farland, B. G. 1970).

Die hervorstechenden Eigenschaften sind eine geringe Reaktivität der Nitroxylgruppe, Temperaturstabilität bis mindestens 70° C, pH-Stabilität im Bereich von 2 - 10.

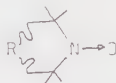


Abb.12:

Chemische Grundstruktur von Radikalsonden.

Die Gruppe R dient dazu, das Radikal an andere Moleküle anzuhängen. Die Bindung kann durch eine chemische Reaktion kovalent oder durch schwächere Kräfte wie Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Wechselwirkung erfolgen. In den Versuchen wurde mit dem Fettsäure-Label 12,3 und Tempo-Label gearbeitet.

V.2.1. Fettsäure-Label 12,3

Der Label besteht aus einer Fettsäurekette (Stearinsäure) und einem Oxazolidonring.

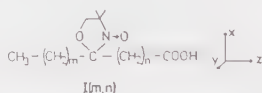


Abb.13:

Fettsäure-Label 12,3

"m" legt die Anzahl der C-Atome zwischen dem Ring und der Methylgruppe am apolaren Ende des Labels fest, während "n" die Anzahl der C-Atome zwischen dem Ring und der Säuregruppe bestimmt.

Da der Label den amphiphilen Komponenten des Lipidteils der Membran ähnelt, eignet er sich gut zur Untersuchung solcher Doppelschichten.

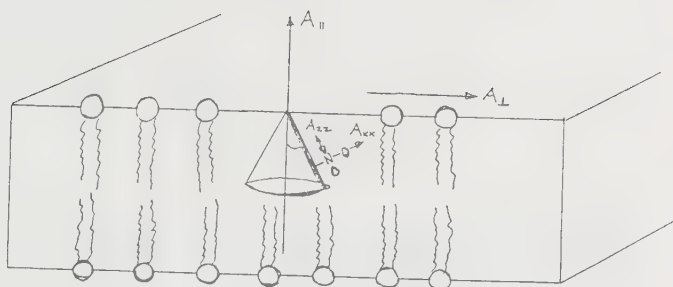


Abb.14:

Anisotrope Bewegung eines Spin-Labels in einer Lipidmembran.

Bei Fettsäureradikalen ist die z-Achse des p-Orbitals parallel zur Moleküllängsachse angeordnet. In Membranen wird es senkrecht zur Membranoberfläche angeordnet. Allerdings rotiert das Molekül je nach Viskosität der Umgebung um einen bestimmten Winkelbetrag um die gedachte Ruhelage. Da die Beweglichkeit des Labels in Membranen besonders in Nähe der polaren Kopfgruppe der Membran eingeschränkt ist, ist die Winkelabweichung kleiner als z. B. beim Fettsäurelabel 10,5.

V.2.2. Auswertung der Spektren mit 12,3.

S ist ein Maß für die Anisotropie der molekularen Beweglichkeit des Labels in einer Membran (Stone, T. J. 1965)

$$S = \frac{1/3(T_{xx} + T_{yy})(T_{||} - T_{\perp})}{1/3(T_{zz} - T_{xx})(T_{||} + 2T_{\perp})} \quad \text{bez.} = 1,696 \frac{(2T_{||} - 2T_{\perp})}{(2T_{||} + 4T_{\perp})}$$

$2T_{||}$ = Außenaufspaltung des Spektrums
(Tesla)

$2T_{\perp}$ = Innenaufspaltung des Spektrums
(Tesla)

Mit diesem Parameter lassen sich Veränderungen in der Fluidität von Membranen beschreiben.

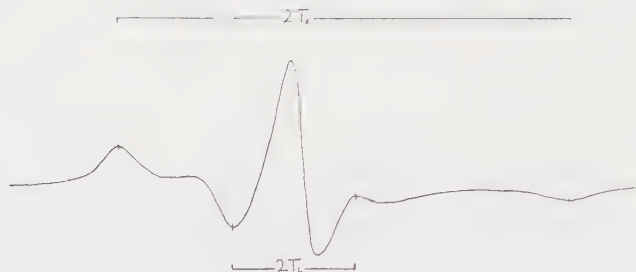


Abb.15:

Anisotropes Spektrum von 12,3 in einer Lipidsuspension mit Außen-und Innenaufspaltung.

S liefert allerdings nur für $0,3 = S = 1,0$ brauchbare Werte da Werte unter 0,3 schon auf stark isotrope Bewegung des Labels hindeuten und $T_{||}$ bez. $T_{\perp}$ nicht mehr aus dem Spektrum ablesbar ist.

Deshalb wird für die Berechnung isotroper Spektren, wie sie in dieser Arbeit bei der Untersuchung von Mizellen auftauchen, die Rotationskorrelationszeit T_c herangezogen (Kivelson, D. J. 1960).

$$T_c = F \cdot \Delta B \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right)$$

F = Proportionalitätsfaktor

ΔB = Linienbreite
(Tesla)

h_0 = Intensität der Mittelfeldlinie (cm)

h_{-1} = Intensität der Hochfeldlinie (cm)

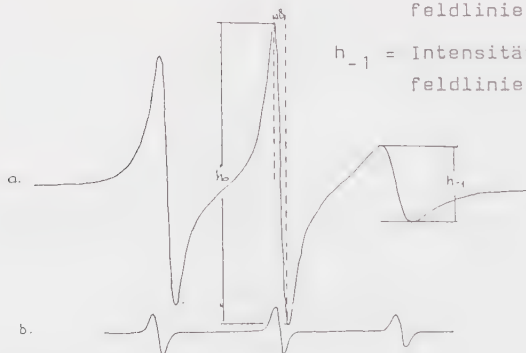


Abb.16:

Isotrope Spektren von 12,3 in H_2O

Die Rotationskorrelationszeit beträgt in a. = 1,52 nanosec
in b. = 0,18 nanosec.

V.2.3. Tempo-Label (2,2,6,6,-Tetramethylpiperidin-1-oxyl)

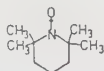


Abb.17:

Strukturformel von Tempo

Tempo ist sehr gut wasserlöslich und befindet sich in Lipid-suspensionen in der polaren Phase. Erhöht man die Temperatur, so verändern Lipide ihre Struktur, mit dem Ergebnis einer Umlagerung von einer kristallinen zu einer flüssig-kristallinen Phase. Diese liquide Phase ist polarer. Als Folge des Verteilungsgleichgewichts von Tempo zwischen organischer und polarer Phase diffundiert Tempo in das Lipid. Dies bietet eine Möglichkeit, Phasenübergänge in Membranen darzustellen.

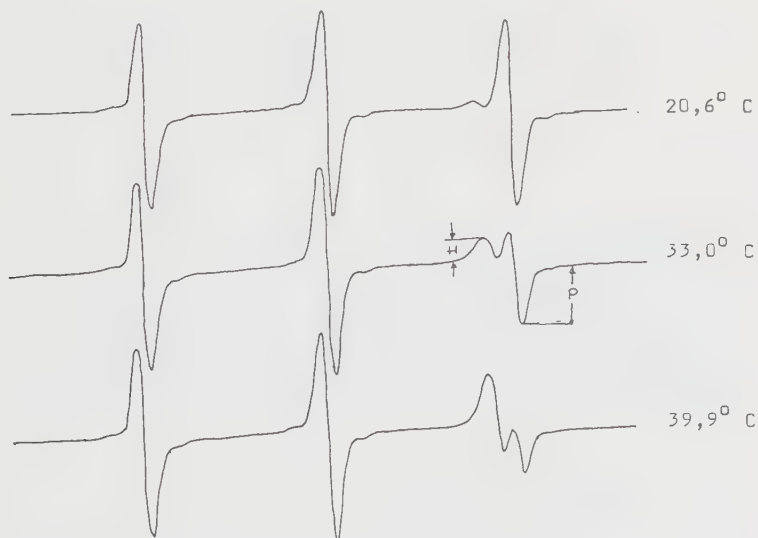


Abb.18:

Resonanzspektrum von Tempo in einer Dispersion von Dipalmitoyl-phosphatidylcholin (54,5 mmol/l)

V.2.4. Auswertung der Spektren mit Tempo

Jedes Spektrum ist eine Superposition zweier Spektren. Eines zeigt den Anteil von Tempo, der sich in der fluiden hydrophoben Region des Lipids befindet, das andere Spektrum zeigt Tempo in der wässrigen Phase. Kleine Unterschiede in der Kopplungskonstanten und dem g-Faktor lösen die Hochfeldlinien auf, während die Mittel- und Niederfeldlinien der beiden Spektren übereinanderliegen.

Der Faktor H entspricht in erster Annäherung der Menge Label, die in der Lipidphase gelöst ist. P ist proportional der Menge Label in der Wasserphase. Mit dem Tempoverteilungsparameter F kann man das temperaturabhängige Phasenverhalten von Lipiden beschreiben (Shimshick, E. J. and Mc Connell, H. M. 1973a).

$$F = \frac{H}{H+P}$$

H = Anteil von Tempo im Lipid

P = Anteil von Tempo in der polaren Phase

V.3. Meßgerät und Einstellung.

Die Spin-Label enthaltenden Proben wurden mit einem Gerät der Fa. Bruker, Karlsruhe, Typ BER-414S gemessen. Die magnetische Feldstärke H_0 betrug rund 3300 Gauss, die durchfahrene Feldstärke maximal ± 100 Gauss = 200 Gauss, Die Mikrowellenfrequenz betrug rund 9,3 Giga-Hz.

V.3.1. Temperatureinrichtung.

Die Proben wurden während temperaturabhängigen Messungen in der cavity von Heptan umspült, welches in einem Kreislauf durch eine Pumpe bewegt wurde. In den Kreislauf war eine regelbare Heizung angebracht. Die Temperaturkontrolle

wurde durch ein Voltmeter gewährleistet, dessen Bimetallelektroden sich einmal als Referenz in Eiswasser, bez. in der cavity befanden. Vor der Messung wurde das Gerät in Eiswasser geeicht (0°C). Die Anzeige in mV konnte mittels einer Tabelle auf $^{\circ}\text{C}$ umgerechnet werden. Die Genauigkeit betrug $0,2^{\circ}\text{C}$.

Die Temperaturerhöhung betrug pro Messvorgang ungefähr 3°C , die Meßgeschwindigkeit rund 10°C/h .

V.3.2. Fluoreszenzmessungen.

Mashige, F. (1976) entwickelte eine Methode zur Bestimmung von Gallensäurenkonzentrationen, die bis in den nanomolaren Bereich wirksam ist.

Das Meßprinzip beruht auf der Übertragung von Wasserstoff der Gallensäurehydroxygruppen durch die NAD-Diaphorase auf einen fluoreszierenden Farbstoff, das Resazurin.

Die Messungen wurden mit Hilfe eines Perkin-Elmer Fluoreszenzspektrophotometers, Typ MPF-4, durchgeführt.

Die Einstellung für die Emission betrug 580 nm, für die Excitation 560 nm.

Eine quantitative Analyse kann nur durch Vergleich mit Standards durchgeführt werden. Deshalb wurden vor den Messungen eine Taurocholsäure-Eichkurve bestimmt. Dazu wurde Taurocholsäure in einer Verdünnungsreihe angelegt und diese gegen einen Leerwert gemessen.

Es berechnet sich somit: gemessene E Faktor (Eichkurve) = Gallensäurekonzentration mol/l.

VI. Ergebnisse.

VI.1. Mizellierung von Taurocholsäure.

Wie im Kapitel Gallensäuren beschrieben, ist die Mizellierung der Gallensäuren essentiell für den gesamten Vorgang der Verdauung, sei es die Resorption von Fetten aus dem Darm-lumen, die Löslichkeit von Cholesterin in der Gallenflüssigkeit o. ä.. Im folgenden wird die Anwendbarkeit der Elektronenspinresonanzmethode auf den Mizellierungsprozeß von Gallensäuren, speziell der Taurocholsäure, untersucht.

Zusätzlich wird bestimmt, welchen Einfluß Fremdstoffe auf die Mizellierung ausüben. In der Arbeit wird der Einfluß von Chlorpromazin untersucht, da es ein großes cholestatisches Potential besitzt und möglicherweise auch mit Gallensäuren wechselwirkt.

Die Taurocholsäure ist ein Derivat der Cholansäure und hat neben der allen Gallensäuren gemeinsamen 3 -Hydroxylgruppe zwei weitere in der 7 und 12-Position. Die ihr eigen Struktur befähigt sie, Mizellen zu bilden. Die Mizellierung ist neben Temperatur und pH-Wert auch von der Ionenstärke abhängig.

Als Meßsonde wird der Label 12,3 verwendet, der in Flüssigkeiten isotrope Beweglichkeit zeigt. Diese wird durch den Rotationskorrelationskoeffizienten T_c charakterisiert, der angibt, wie lange ein Molekül benötigt, sich in eine bestimmte Richtung umzuorientieren. Mit Hilfe der Relaxationstheorie und der Annahme, daß die Spektrallinien Lorentzgestalt besitzen, und gleiche Intensitäten haben, ergibt sich:

$$T_c = 1,083 \cdot \Delta B \cdot \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_0 - 1}} - 1 \right) \text{ in nanosec}$$

Setzt man T_c in Bezug zu steigenden Taurocholsäurekonzentrationen, läßt sich anhand der Graphik die kritische mizellare Konzentration bestimmen.

Es wurde eine 50 mmolare Na-TC-Lösung und daraus mit Puffer die gewünschten Endkonzentrationen hergestellt. Sie betrugen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 und 20 mmol/l. Der Label wurde in Methanol gelöst, in Eppendorfgefäße verbracht und evaporiert. Seine Endkonzentration in den einzelnen Proben betrug unter 0,01 mmol/l. Die Na-TC-Lösungen wurden in die Eppendorfgefäße mit Label gegeben und zwecks Mizellenbildung eine 1/2 Std. gerüttelt. Dadurch wurde auch der Label von der Gefäßwand abrotiert. Jeweils 10 μ l der einzelnen Proben wurde gemessen.

VI.1.1. Ergebnisse.

In Abb. 26 ist die gemessene Rotationskorrelationszeit T_c als Funktion der Taurocholsäurekonzentration dargestellt. Der Wert bleibt bis rund 3 mmol/l praktisch konstant. Die Mizellierung erstreckt sich von 4-10 mmol/l und erreicht bei 5,5 mmol/l einen Plateauwert. Oberhalb 10 mmol/l ist die Zunahme von T_c sehr gering.

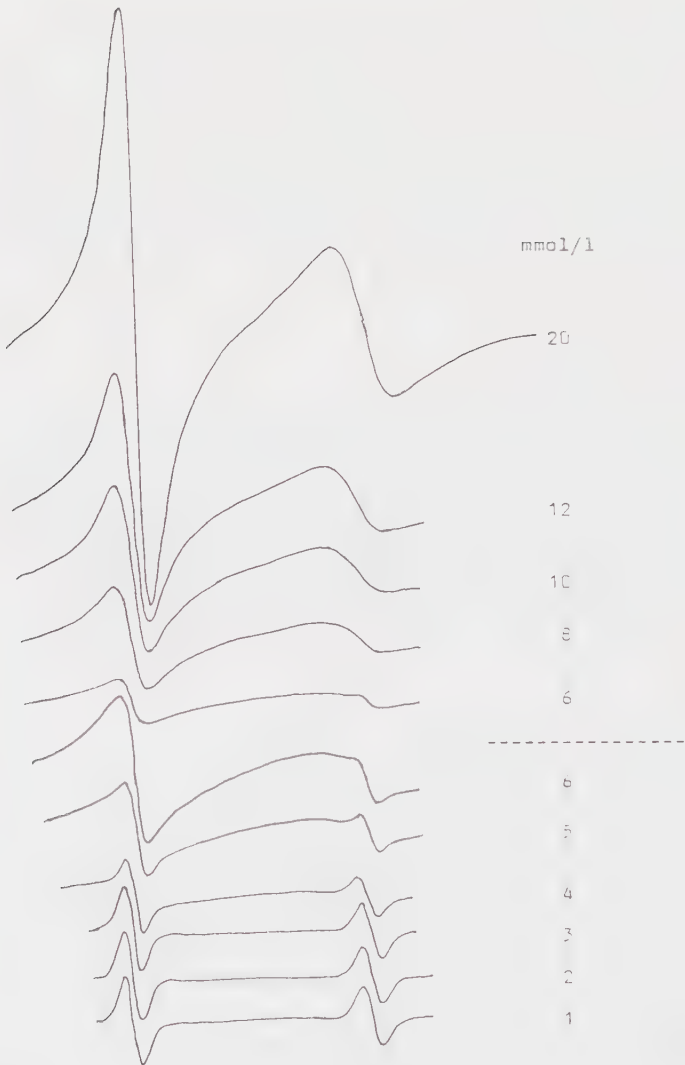


Abb.20:

1. Ableitung des Resonanzspektrums von 12,3 in TRIS-Puffer (150 mmol/l). Mizellenbildung von Taurocholsäure, 1-20 mmol/l.

VI.2. Mizellierung von Taurocholsäure unter dem Einfluß von Chlorpromazin.

Verschiedene Autoren berichten, daß mizellenbildende Gallensäuren einen protektiven Effekt gegen die Cholestasewirkung von Lithocholsäure und Taurolithocholsäure besitzen.

Über Chlorpromazin und seine eventuelle Beeinflussung durch Taurocholsäure ist nichts bekannt. Deshalb wurde zuerst versucht, Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Substanzen in wässrigem Medium darzustellen. Die Auswertung erfolgte wieder nach dem T_c -Wert in Abhängigkeit von der Taurocholsäure- und der Chlorpromazin-Konzentration.

Die Herstellung dieser Versuchsreihe unterscheidet sich von der vorhergehenden lediglich dahingehend, daß zusätzlich Chlorpromazin gewünschter Konzentration den fertigen Taurocholsäure-Label-Präparationen zugefügt wurde. Die Proben wurden zusätzlich eine Std. unter Lichtabschluß (Chlorpromazin wird unter Lichteinfluß zerstört) gerüttelt und dann sofort gemessen.

VI.2.1. Ergebnisse.

Abb. 21-25 geben die Resonanzspektren von 12,3, bez. die Beeinflussung der Beweglichkeit des Labels in Abhängigkeit von der Größe der gemischten Mizellen wieder.

Die waagrechten Trennstriche in den Abbildungen deuten an, daß das Signal um ein Mehrfaches verstärkt werden mußte. Die apparative Verstärkung des Meßsignals bedingt aber eine Erhöhung des Signalrauschens, was wiederum die Auswertung der Spektren erschwert. Um die Verstärkung zu verdeutlichen, wurde das Signal Na-TC = 6mmol/l mit beiden Verstärkungen geschrieben.

In den Abbildungen 21-24 läßt sich an der Spektrenform sehr gut die Veränderung des Signals von rein isotrop in Richtung einer Verlangsamung der Bewegung erkennen. Das heißt, man sieht eine Superposition zweier Spektren.

Im Gegensatz zu den Spektren der reinen Gallensäuremizellen beginnt die Einschränkung der Labelbewegung viel früher.

Abb. 25 gibt den Einfluß von 1 mmol/l Chlorpromazin auf die Mizellenbildung wieder. Schon bei 3 mmol/l Taurocholsäure ist das Spektrum sehr breit (β -Werte entsprechen denen bei höheren Gallensäurekonzentrationen). Leider ist aufgrund des Rauschens und der Zerstörung des Labels durch Chlorpromazin die Auswertung der Spektren bei kleinen Gallensäurekonzentrationen nicht möglich. Die genauen Grenzen der Auswertbarkeit erkennt man in Abb. 26.

Abb. 26 zeigt die Mizellierung der Gallensäure in Abhängigkeit von der Chlorpromazinkonzentration. Deutlich zu sehen ist eine Verschiebung des Beginns der Mizellierung zu kleinen Gallensäurekonzentrationen hin. Außerdem verändert sich die Größe der Mizellen in Abhängigkeit von der Chlorpromazinkonzentration.

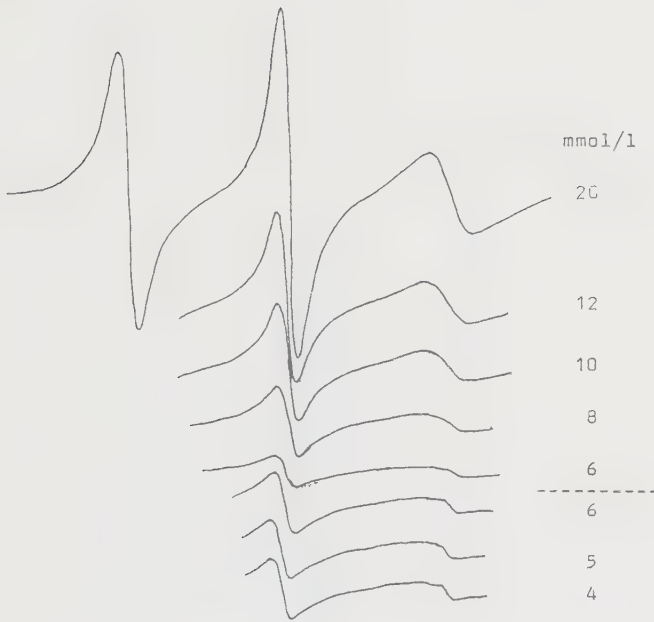


Abb.21:

1. Ableitung des Resonanzspektrums von 12,3 in in TRIS-Puffer (150 mmol). Mizellenbildung von Taurocholsäure, 1-20 mmol/l unter dem Einfluß von Chlorpromazin, 0,2 mmol/l.

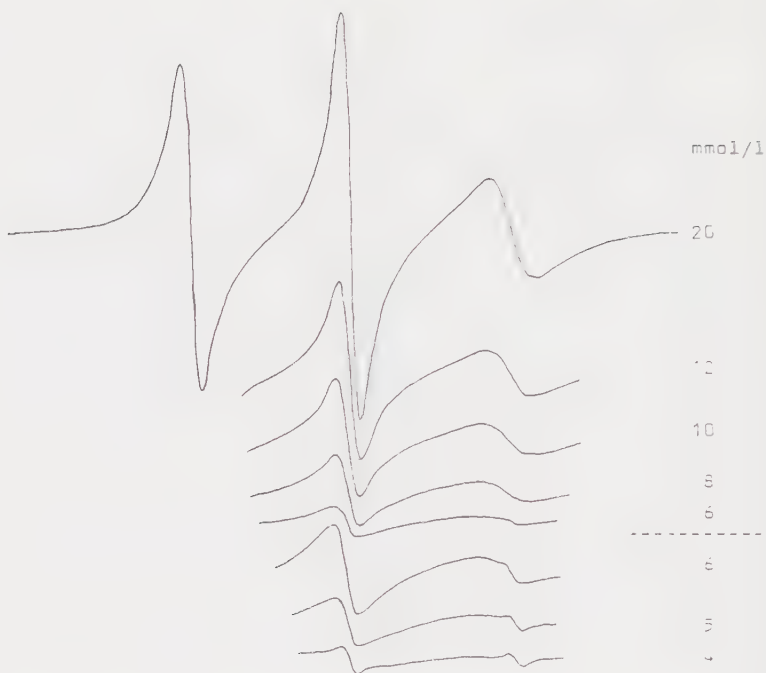


Abb.22:

1. Ableitung des Resonanzspektrums von 12,3 in TRIS-Puffer (150 mmol/l). Mizellenbildung von Taurocholsäure, 1-20 mmol/l, unter dem Einfluß von Chlorpromazin, 0,4 mmol/l.

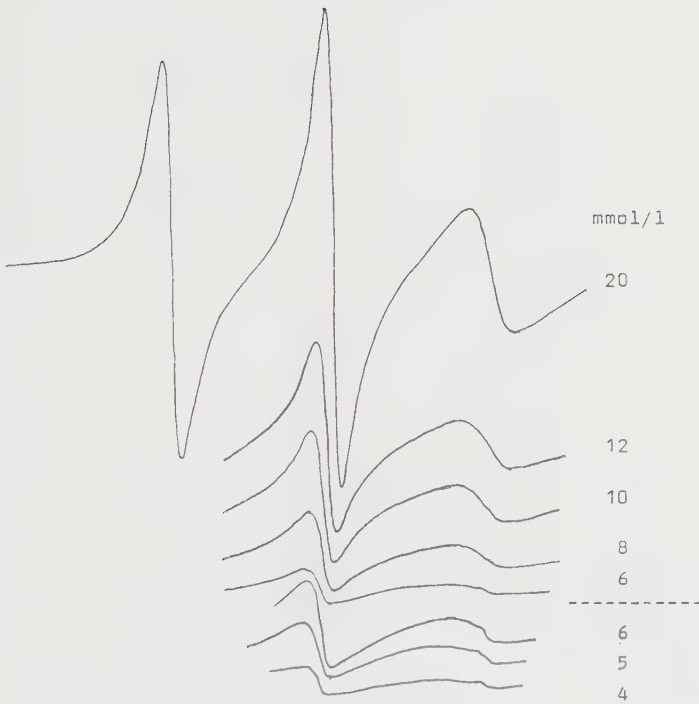


Abb.23:

1. Ableitung des Resonanzspektrums von 12,3 in TRIS-Puffer 150 mmol/l. Mizellenbildung von Taurocholsäure, 1-20 mmol/l unter dem Einfluß von Chlorpromazin, 0,6 mmol/l.

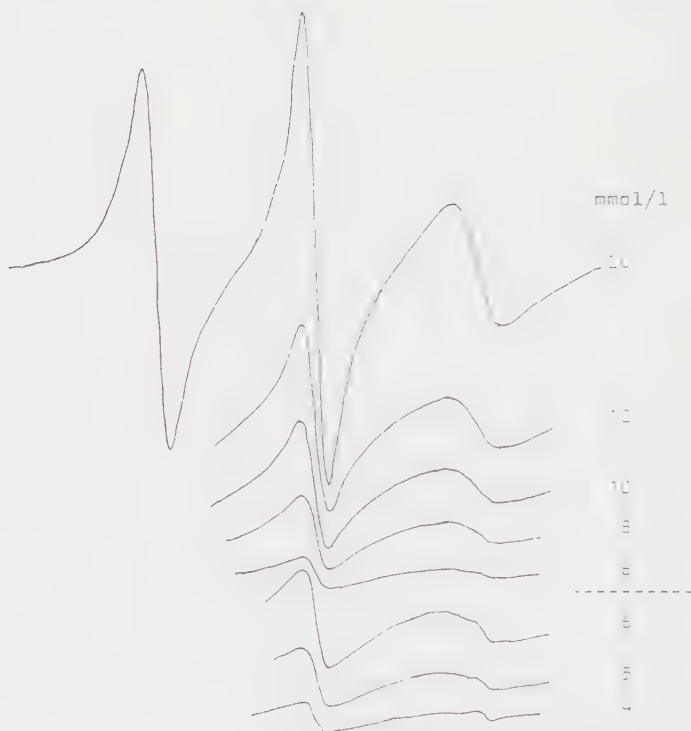


Abb.24:

1. Ableitung des Resonanzspektrums von 12,3 in TRIS-Puffer 150 mmol/l. Mizellenbildung von Taurocholsäure, 1-20 mmol/l unter dem Einfluß von Chlorpromazin, 0,8 mmol/l.

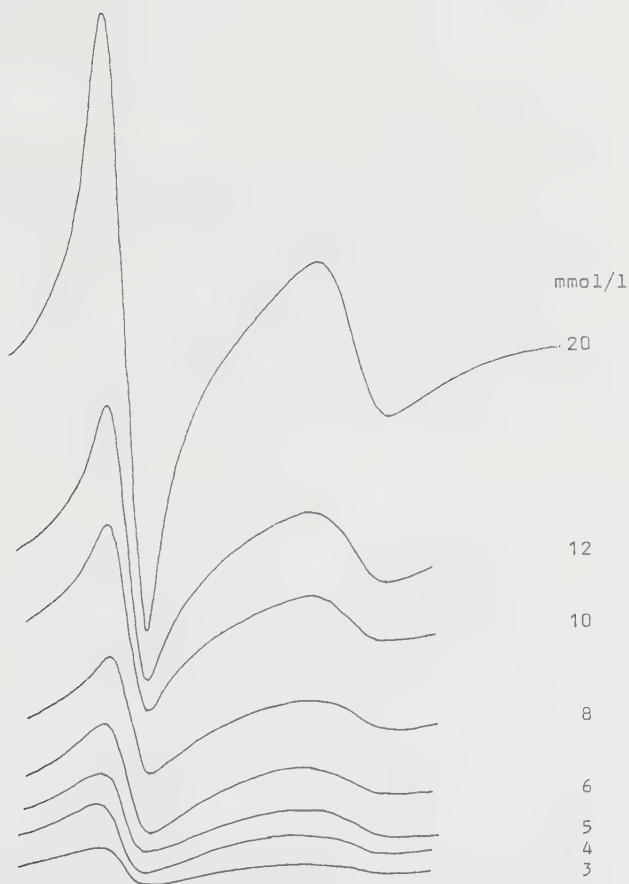


Abb.25:

1. Ableitung des Resonanzspektrums von 12,3 in TRIS-Puffer (150 mmol/l). Mizellenbildung von Taurocholsäure, 1-20 mmol/l unter dem Einfluß von Chlorpromazin 1,0 mmol/l.

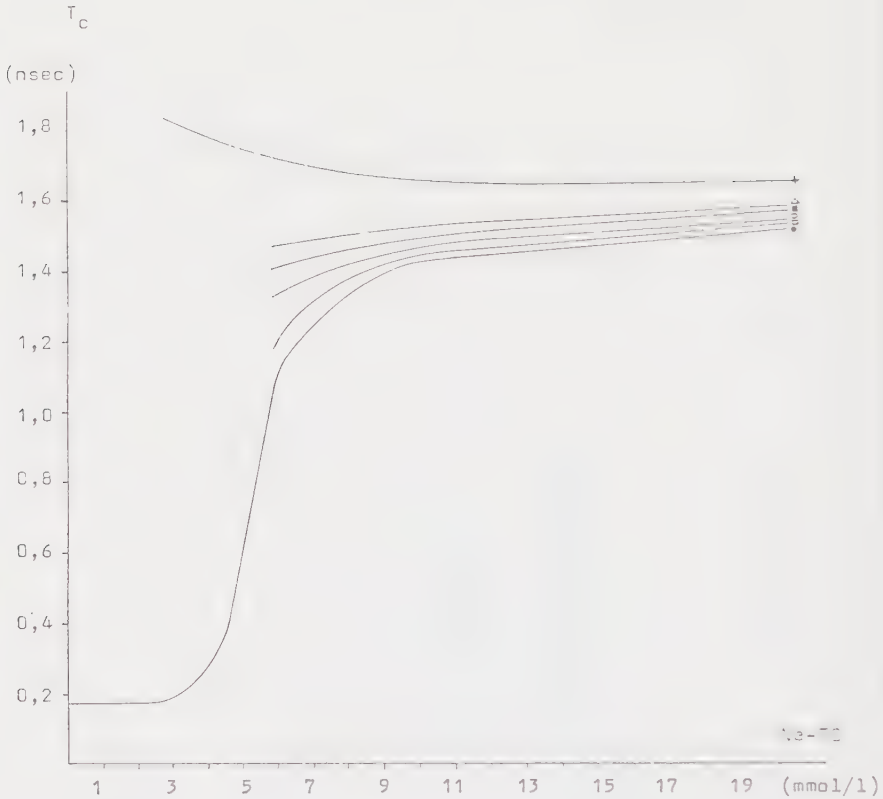


Abb.26:

Rotationskorrelationszeit T_c als Parameter der Mizellierung von Taurocholsäure, aufgetragen gegen die Taurocholsäurekonzentration. (•)

Einfluß von Chlorpromazin auf T_c , 1mmol/l (+), 0,8 mmol/l (Δ), 0,6 mmol/l ($\blacksquare$), 0,4 mmol/l (o), 0,2 mmol/l ($\square$) CPZ.

Aus diesem Bild erkennt man:

1. Die gemischten Mizellen sind offensichtlich größer als reine Gallensäuremizellen.
2. Die kritische mizellare Konzentration von Taurocholsäure wird durch Chlorpromazin erniedrigt.

VI.3. Einfluß von Chlorpromazin auf die Signalintensität des Labels 12,3.

Die Größe der Resonanzspektren ist nicht nur von der Menge Label abhängig, die sich in die Mizellen einlagert, sondern auch von der Beeinflussung von Chlorpromazin.

Jeweils 50 μ l 12,3 (Konzentration unter 0,1 mmol/l) wurde mit einer 2 mmolaren Chlorpromazinelösung und TRIS-Puffer gemischt, bis Chlorpromazin folgende Endkonzentrationen aufwies: 1,0; 0,5; 0,33; 0,25; 0,1; 0,05 und 0 mmol/l.

Die Proben wurden eine Stunde gerüttelt und danach sofort gemessen. Ausgewertet wurde die Intensität, bez. die Höhe des Mittelfeldsignals in cm. in Abhängigkeit von der Chlorpromazinkonzentration.

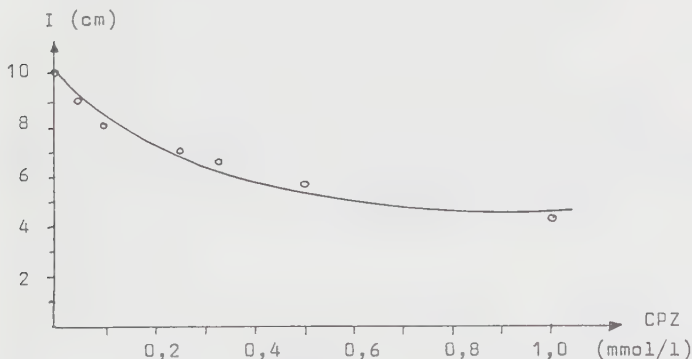


Abb. 27:

Intensität des Labels 12,3 als Funktion der Chlorpromazinkonzentration.

VI.3.1. Ergebnis.

Im Abb. 27 läßt sich erkennen, daß abhängig von der Chlorpromazinkonzentration die für das Zustandekommen des Signals verantwortliche Labelmenge kleiner wird. Die Labelmenge ist proportional zur Signalgröße.

VI.4. Untersuchungen an Gallensäure-Lipid-Mischsystemen.

VI.4.1. Bestimmung der Phasenumwandlungstemperatur T_U von Dipalmitoylphosphatidylcholin.

Die T_U von Dipalmitoylphosphatidylcholin dient als Referenz für alle weiteren Messungen und wurde mit Hilfe des Labels 12,3 bestimmt.

DFL und 12,3 wurden in Chloroform gelöst, mit N_2 abgegast und 3 Std. lyophilisiert. Nach der 1 Std. dauernden Liposomenbildung mittels Puffer wurde die Probe 10 min zentrifugiert (10 000 U/min) und das Sediment gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand der 1. Ableitung der Resonanzspektren der jeweils gemessenen Temperatur nach den Parametern $2T_{11}$ und $2T_{12}$. Damit wurde der Ordnungsparameter S für jede individuelle Temperatur berechnet und als Funktion der Temperatur in ein Diagramm eingetragen. Als Beispiel für die Auswertung nach $2T_{11}$ und $2T_{12}$ ist die Abb. 29 angegeben. Abb. 28 beschreibt über den Ordnungsparameter S die temperaturabhängige Fluidisierung der Membran. Der Wendepunkt der Kurve beschreibt gleichzeitig die Phasenumwandlungstemperatur T_U .

VI.4.2. Ergebnisse.

In Abb. 28 sieht man die temperaturabhängige Fluidisierung der Lipidmembran mit der Vor- und Hauptphasenumwandlung. Die entsprechenden Werte betragen $30,2^\circ \text{C}$ und $40,6^\circ \text{C}$. Zu erkennen ist auch, daß die Umwandlung sehr schnell, d. h. über einen kleinen Temperaturbereich von max. 2°C geschieht. Dies ist ein Hinweis auf die Kooperativität der Lipidmembran,

VI.4.3. Bestimmung der T_u von Mischsystemen (Gallensäure-Lipid).

Um den Einfluß von Gallensäuren auf die künstliche Membran zu bestimmen, wurde Taurocholsäure und 12,3 methanolisch, das Lipid in einer 1:1 Mischung von Chloroform und Methanol gelöst. mit N_2 abgegast und 3.Std. lyophilisiert. Die Liposomenbildung erfolgte mit Puffer eine Std. auf dem Rüttler. Die Proben wurden dann über Nacht bei $50^\circ C$ getempert und anschließend noch eine Std. gerüttelt. Nach der Zentrifugation (10 min, 10 000 U/min) erfolgte die Messung des Sediments.

Die Auswertung erfolgte nach dem Schema in VI.4.1..

Abb. 30 zeigt als Beispiel die Verschiebung der Phasenumwandlungstemperatur in Abhängigkeit von steigenden Taurocholsäurekonzentrationen in der Lipidmembran.

VI.4.4. Ergebnisse.

Abb. 30 beschreibt die Erniedrigung der Phasenumwandlungstemperatur in Abhängigkeit von der steigenden Gallensäurekonzentration in der Lipidmembran. Die Kurve ist nicht linear sondern scheint gegen einen Grenzwert zu laufen, der bei $35^\circ C$ liegt.

VI.4.5. Bestimmung des Einflusses von Chlorpromazin auf die T_u von Dipalmitoylphosphatidylcholin.

Um die Wechselwirkung von Chlorpromazin mit der Lipidmembran zu untersuchen wurden zuerst Liposomen hergestellt (VI.4.1.), nach Zugabe der wässrigen CPZ-Lösungen wie die Na-TC-DPL Systeme weiterverarbeitet und nach VI.4.1. ausgewertet. Die T_u für jedes Molverhältnis wurde dreimal ermittelt (drei Präparationen pro Molver.). Die Abweichungen vom entsprechenden Durchschnittswert betrug $\pm 2,5\%$.

VI.4.6. Ergebnisse.

Im Gegensatz zur Taurocholsäure stört Chlorpromazin die Lipidstruktur ganz erheblich. Die T_U ist bei dem System CPZ/DPL = 0,3 um fast mehr als 12°C gegenüber der T_U der reinen Lipidmembran verringert.

Die Phasenumwandlungstemperaturen für jedes Molverhältnis wurde dreimal ermittelt (jeweils drei Präparationen). Die Abweichung vom entsprechenden Durchschnittswert betrug $\pm 2,5\%$.

VI.4.7. Versuche zur Ermittlung des Schutzeffektes von Taurocholsäure gegen die Wirkung von Chlorpromazin auf die Lipidmembran.

Die Anzahl der Präparationen und die Abweichung vom Durchschnittswert entsprach den oben genannten Angaben.

Die Präparation dieser Mischsysteme unterschied sich dahingehend, daß bis einschließlich zur Liposomenbildung nach VI.4.2. verfahren wurde. Daraufhin wurde CPZ((wässrige Lösung) zugefügt und weiter nach VI.4.2. vorgegangen.

VI.4.8. Ergebnisse.

Abb. 33 beschreibt den Effekt von Taurocholsäure auf die Wirkung von Chlorpromazin bezüglich der Lipidmembran. Schon kleine Mengen (Molver. Na-TC/DPL = 0,05) scheinen zu genügen um der fluidisierenden Wirkung des Chlorpromazins entgegenzuwirken. Bei einem Molver. von CPZ/DPL = 0,3 + Na-TC/DPL = 0,2 verschiebt sich die T_U gegenüber der T_U des CPZ/DPL-Systems um rund 4°C nach höheren Temperaturen.



Abb. 28:

Ordnungsparameter S und Intensität I als Funktion der Temperatur. Label 12,3 inkorporiert in Liposomen aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (54,5 mmol/l). Die Vorphasen- und Hauptphasen-Umwandlung ist an den steil gestellten Abschnitten der Diagramme zu erkennen und beträgt 30,2° C und 40,6° C.

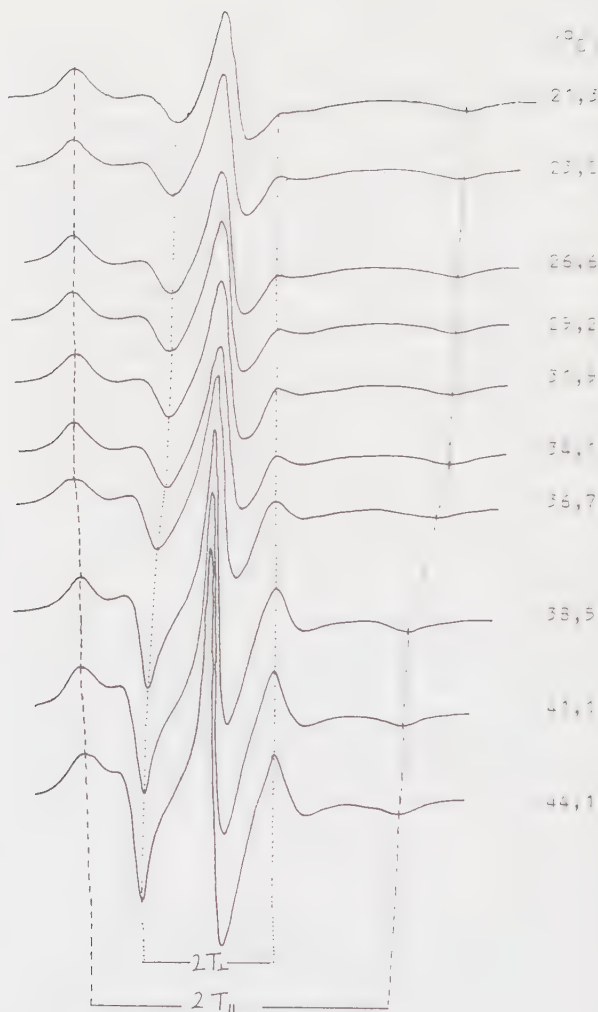


Abb.29:

1. Ableitung des Resonanzspektrums von 12,3 in gemischten Vesikeln aus Taurocholsäure und Dipalmitoylphosphatidylcholin, Molverhältnis 0,20. Eingezeichnet sind die Parameter $2T_H$

(Außenaufspaltung) und $2T_L$ (Innenaufspaltung) als Maß für die Fluidisierung der Membran abhängig von der Temperaturerhöhung.

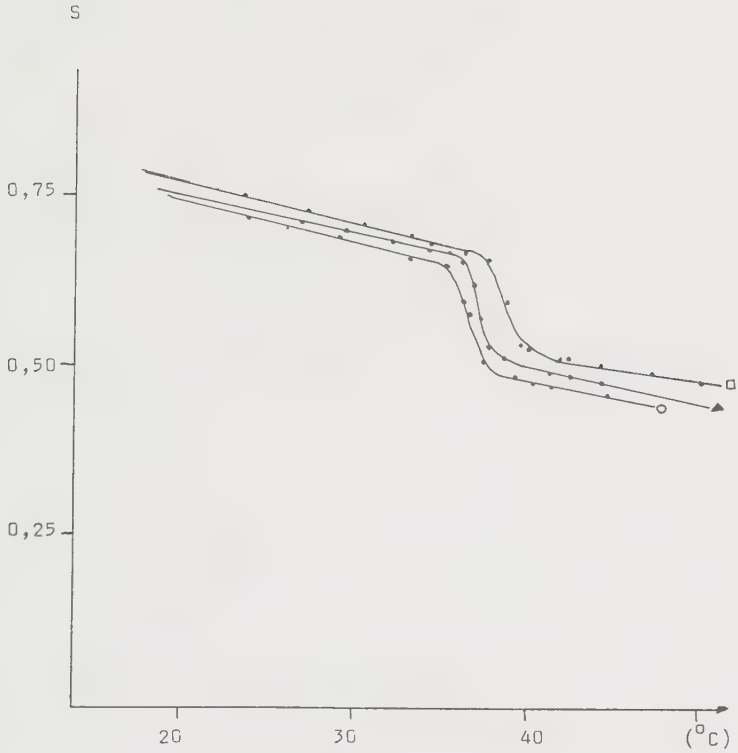


Abb.30:

Ordnungsparameter S als Funktion der Temperatur und des Molverhältnisses von Taurocholsäure zu Dipalmitoylphosphatidylcholin. Molverhältnis 0,10 (□), 0,20 (▲), 0,30 (○).

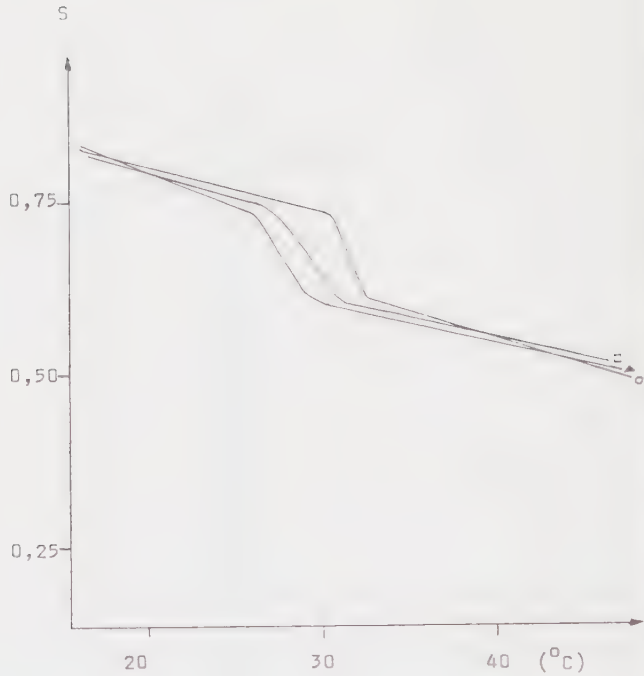


Abb.31:

Ordnungsparameter S als Funktion der Temperatur und des Molverhältnisses von Chlorpromazin zu Dipalmitoylphosphatidylcholin. Molverhältnis 0,10 (○), 0,20 (□), 0,30 (▲).

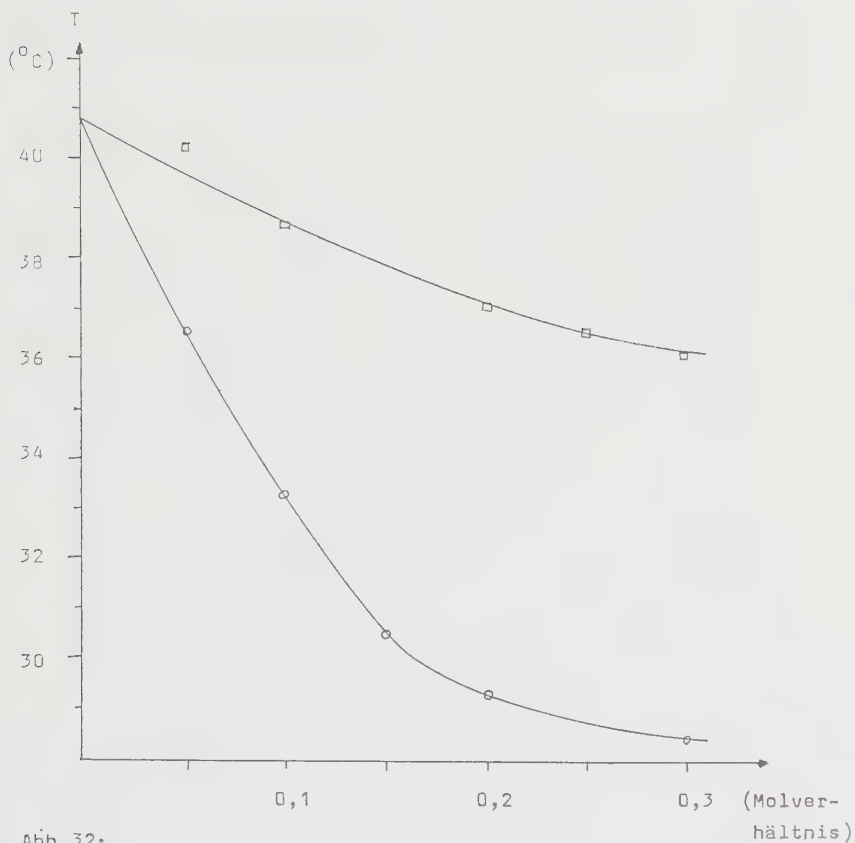


Abb.32:

Zu sehen ist die Phasenumwandlungstemperatur T_u als Funktion des Molverhältnisses von Na-TC und DPL (□), bez. von CPZ und DPL (○). Man erkennt, wie jeweils in Abhängigkeit der Zunahme von Fremdmolekülen in den Liposomen die T_u sinkt.

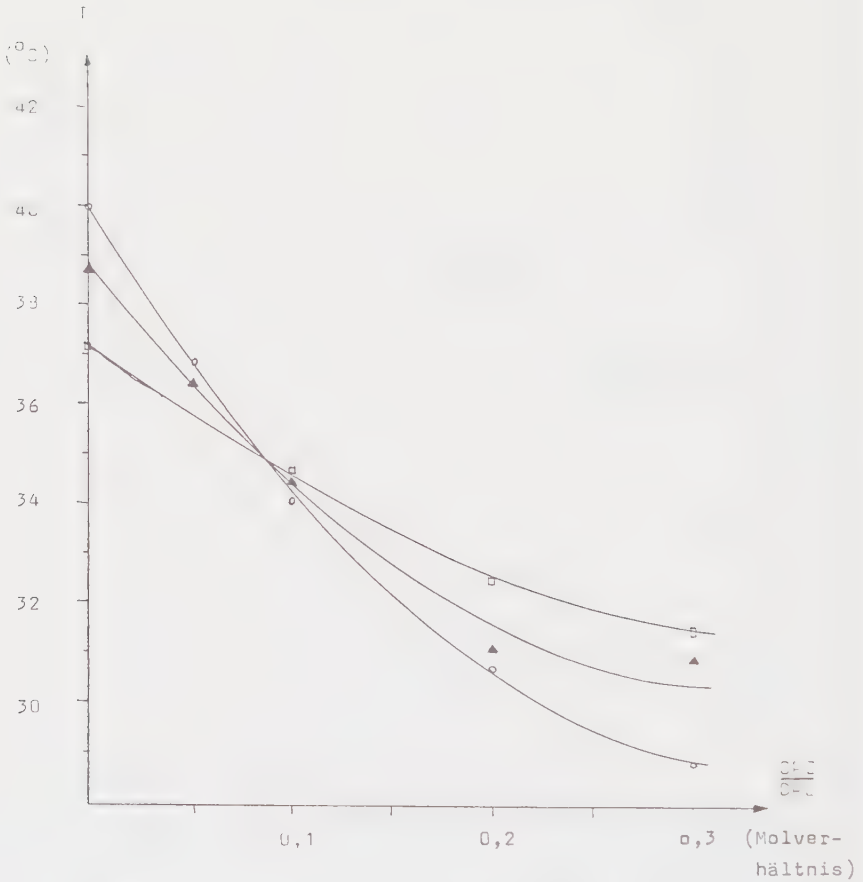


Abb. 33:

Dargestellt ist die Phasenumwandlungstemperatur T_c als Funktion von CPZ und DPL unter dem Einfluß von Na-TC.

Molverhältnis Na-TC = 0,05 (○), = 0,10 (▲), = 0,20 (□).

VI.5. Laterale Phasentrennungen in Lipidmischungen, dargestellt am Beispiel des 3-Phasensystems Lithocholsäure-Cholesterin-Dipalmitoylphosphatidylcholin.

Temperaturinduzierte flüssig-kristalline/kristalline Phasentrennungen wurden in einer Vielzahl von Lipidmischungen beobachtet. Solche Phasentrennungen lassen sich an natürlichen Membranen, wo die Phasenumwandlung oft sehr breit ist, besonders gut jedoch an Modellmembranen mit einem scharfen, charakteristischen Übergang, erkennen. Der Einfluß der Temperatur läßt sich am besten mit Hilfe von Phasendiagrammen beschreiben. Mit Hilfe des Spin-Labels Tempo können derartige Diagramme für verschiedene Lipidmischungen erstellt werden (Shimshick, E. J. and Mc Connell, H. M. 1973a).

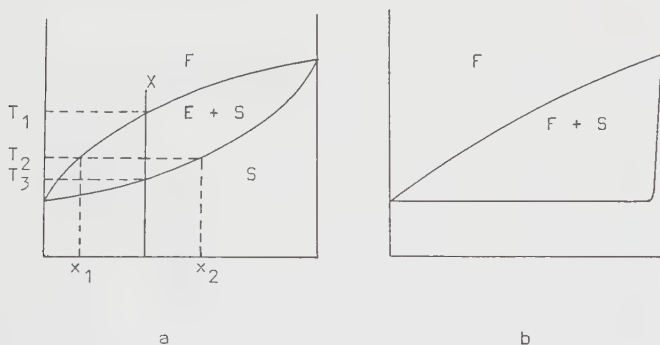


Abb. 34:

a. Phasendiagramm eines mischbaren, b. eines nicht mischbaren Systems.

In Abb. 34a ist ein typisches Phasendiagramm für zwei sehr ähnliche Komponenten, die sich in der flüssigen wie auch der festen Phase miteinander mischen, dargestellt. Betrachtet man

eine bestimmte Lipidmischung der Komposition X , gibt es bei allen Temperaturen bis zu T_1 nur eine flüssige Phase, bestehend aus der Komposition X . Ähnlich ist von T_3 an abwärts nur eine feste Phase, bestehend aus der Zusammensetzung X , vorhanden. Bei der Temperatur T_2 jedoch, sind sowohl flüssige wie feste Phase vorhanden. Die flüssige Phase besteht aus der Komposition x_1 und beinhaltet einen größeren Anteil der bei niedrigerer Temperatur schmelzenden Komponente, während die feste Phase aus der Komposition x_2 besteht und einen größeren Anteil an dem bei höherer Temperatur schmelzenden Lipid besitzt.

Sind die Lipidkomponenten in ihrem Aufbau sehr unterschiedlich, trennen sich die Komponenten in verschiedene Regionen auf. Es kommt zu einer Phasentrennung. Das Phasendiagramm entspricht dann der Abb. 34b. Das Charakteristische an einer solchen nicht-Mischbarkeit ist der waagrechte Verlauf zwischen fester und flüssig-kristalliner Phase.

Phasendiagramme können mit Hilfe des Verteilungsverhaltens von Tempo in Lipidmischsystemen konstruiert werden. Der Parameter F , der das Verteilungsverhalten von Tempo beschreibt, kann in Abhängigkeit von der Temperatur in ein Diagramm aufgetragen werden. Der Verlauf der Kurve ist gekennzeichnet von zwei Knickpunkten, die jeweils einem Punkt auf der flüssigen und soliden Kurve im Phasendiagramm entsprechen.

Oberhalb der Temperatur T_1 befindet sich die Lipidmischung der Zusammensetzung X in einem flüssigen Zustand und die Löslichkeit von Tempo in der Lipidmembran ist sehr hoch. Unterhalb dieser Temperatur, die gleichbedeutend ist mit dem Beginn der Phasentrennung, kristallisieren feste Bereiche aus und koexistieren mit flüssigem Lipid. Da sich der Label in der festen Phase nicht löst, markiert der Punkt T_1 den Abfall in der Löslichkeit von Tempo in der Lipidphase, bez. den oberen Knickpunkt im Tempo-Verteilungsdiagramm. Ist T_3 erreicht, befindet sich der größte Teil von Tempo in der polaren Phase, gekennzeichnet durch einen zweiten Knick im Tempo-Verteilungsdiagramm.

Um ein Cholesterin-Dipalmitoylphosphatidylcholin-Diagramm zu konstruieren, wurden die beiden Substanzen in der gewünschten Menge in einer 1:1 Mischung von Methanol und Chloroform gelöst, mit N_2 abgegast und drei Std lyophilisiert. Die Liposomenbildung erfolgte mit 10 mmolarem Puffer, indem die Proben 1 Std. auf dem Rüttler bewegt wurden. Zur Einstellung des Phasengleichgewichts wurden die Proben über Nacht bei $50^{\circ}C$ getempert. 1 Std. vor der Messung wurde den Proben Tempo zugefügt, und diese nochmals 1 Std. gerüttelt, um Tempo in beiden Phasen zu verteilen.

Zur Erstellung eines Dreiphasensystems mit Lithocholsäure wurden alle drei Komponenten in gewünschter Konzentration im selben Lösungsmittel wie oben beschrieben, gelöst.

Danach wurde wie oben beschrieben verfahren.

Um das Dreiphasendiagramm zeichnen zu können, mußte auch ein Tempo-Verteilungsdiagramm für das System Na-LC/DPL = 0,10 konstruiert werden.

Die Präparation dieses Systems erfolgte nach gewohntem Schema wie oben beschrieben.

VI.5.1. Ergebnis des Tempo-Verteilungsdiagramms für Na-LC/DPL = 0,10.

Abb. 36 gibt den Beginn des Phasendiagramms für das Dreiphasensystem wieder. Der in Abb. 35 zu beobachtende Vorphasen-Übergang der reinen DPL-Liposomen ist verschwunden und die ganze Phasenumwandlung erfolgt über einen größeren Temperaturbereich ($36-42^{\circ}C$).

VI.5.2. Ergebnis des Phasendiagramms Cholesterin-Dipalmitoylphosphatidylcholin.

Das Ergebnis ist in Abb. 39 wiedergegeben. Dieses System zeigt eine teilweise nicht-Mischbarkeit bis zu einem Molenbruch von rund 0,25 Chol/DPL. Die Werte entsprechen denen, die in der Literatur gefunden wurden.

VI.5.3. Ergebnisse des Phasendiagramms Lithocholsäure-Cholesterin-Dipalmitoylphosphatidylcholin.

Die fluide Kurve zeigt, soweit konstruiert, einen dem Cholesterin identischen Verlauf. Die solide Kurve zeigt eine gegenüber dem Zweiphasensystem erhöhte Nicht-Mischbarkeit bis rund 0,32 Molenbruch Chol/DPL. Zusätzlich ist sie zu tieferen Temperaturen verschoben, was eine Fluidisierung der Membran bedeutet. Die Kurven konnten auch nicht wie beim Zweiphasensystem bis zum Schmelzpunkt von Cholesterin extrapoliert werden, da das Mischsystem Lithocholsäure-Cholesterin zwei Schmelzpunkte hat (Abb. 39).

Die Verminderung der Kooperativität, ersichtlich aus den Abb. 37 und 38, die mit steigendem Molenbruch schließlich zum Verschwinden der Phasenumwandlungstemperatur führt, läßt sich mit dem Phasendiagramm erklären.

Bis rund 0,25 Molenbruch gibt es eine Phospholipidfraktion, die knapp oberhalb der T_u des Lezithins sich in der fluiden Phase befindet. Erhöht man die Cholesterinkonzentration in der Lipidmischung, verschwindet die Phasenumwandlung.

Über den Punkt hinaus an dem die solide Kurve nicht mehr horizontal verläuft, kann ein Phasenübergang von purem Phospholipid nicht mehr beobachtet werden. Auch eine Fluiditätsabnahme oberhalb der T_u des Lezithins kann dem Diagramm entnommen werden. Durch zunehmende Erhöhung der Cholesterinfraktion ändert sich das System von seinem fluiden Zustand über einen gemischten Zustand, in dem man flüssige wie feste Phasen findet, bis sich schließlich alles Lipid in der kristallinen Phase befindet.

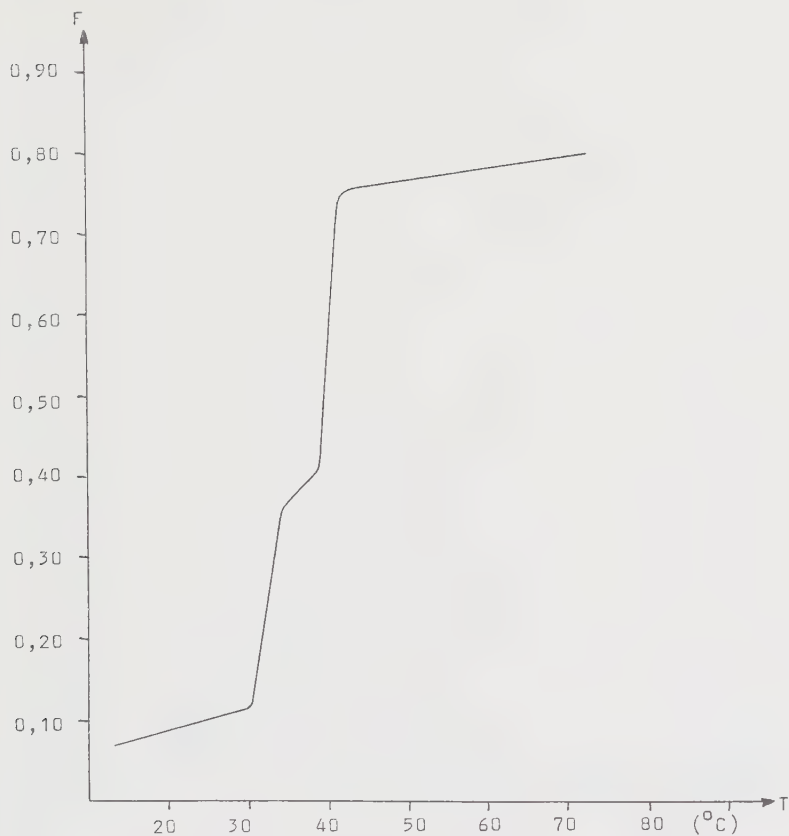


Abb. 35:

Tempo-Verteilungsparameter F als Funktion der Temperatur.
 Tempo in Liposomen aus DPL (50 mmol/l).

Gut zu sehen ist der Vorphasenübergang bei rund 31° C und
 der Hauptphasenübergang bei etwas mehr als 40° C.

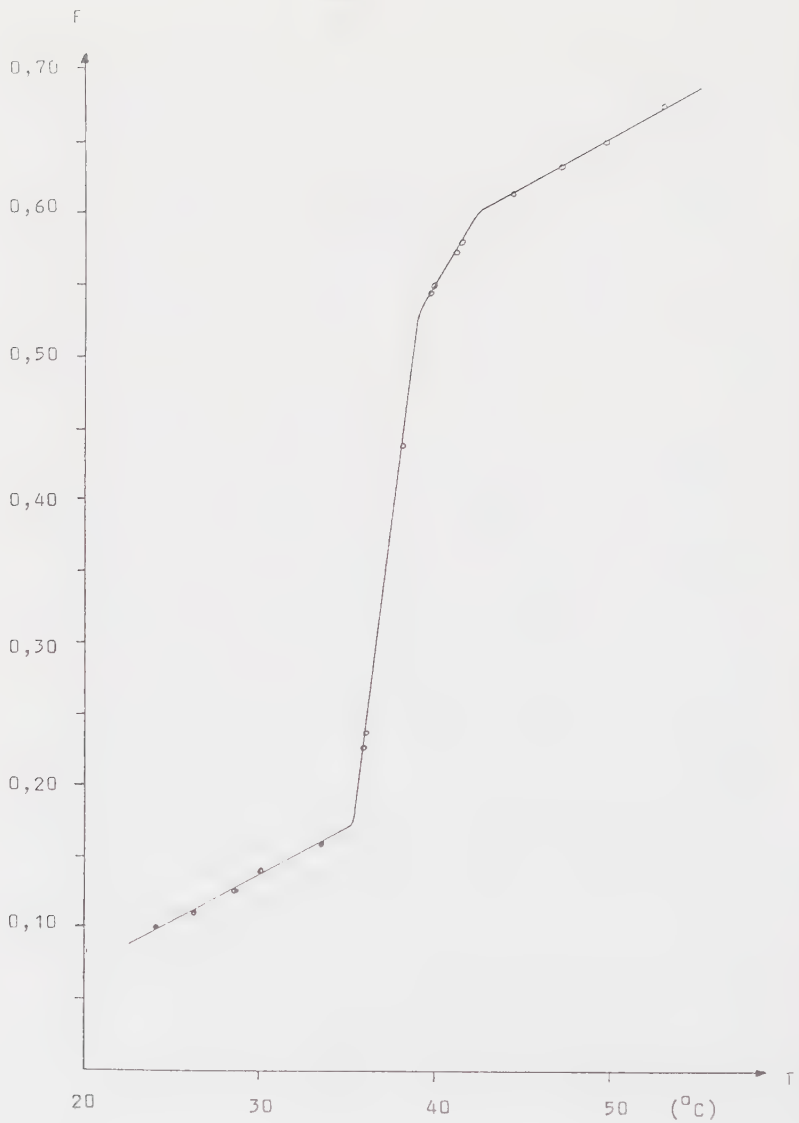


Abb. 36:

Tempo-Verteilungsdiagramm im Zweikomponentensystem
 Na-LC/DPL = 0,10 (Molver.). Der Tempo-Verteilungsparameter
 F ist dargestellt als eine Funktion der Temperatur.

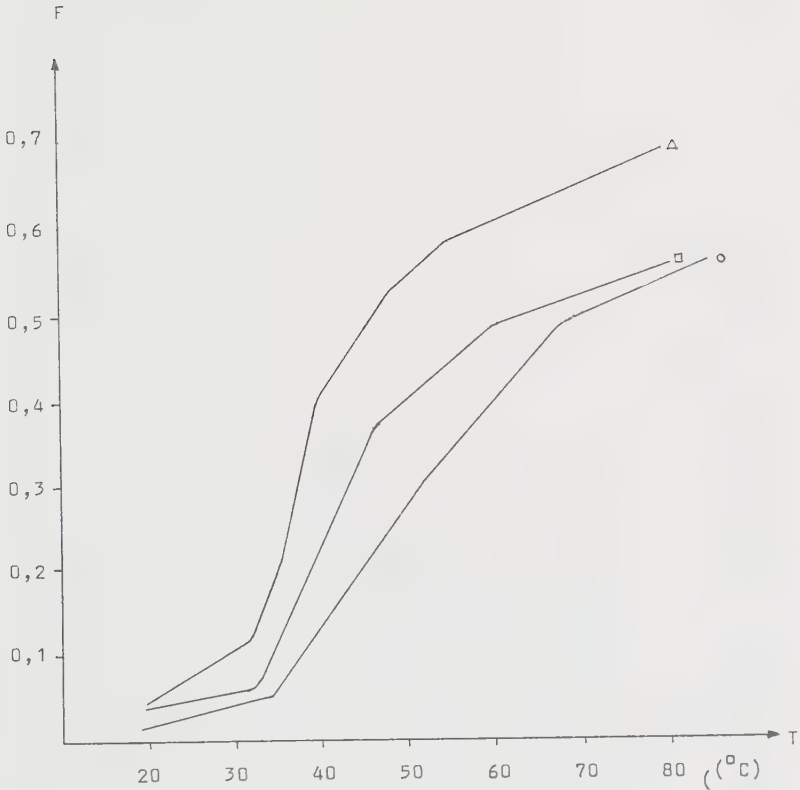


Abb. 37:

Tempo-Verteilungsparameter F als Funktion der Temperatur in Dreiphasensystemen.

$\text{Na-LC/DPL} = 0,10 + \text{Chol/DPL} = 0,10$ (Δ)

$\text{Na-LC/DPL} = 0,10 + \text{Chol/DPL} = 0,20$ ($\square$)

$\text{Na-LC/DPL} = 0,10 + \text{Chol/DPL} = 0,30$ ($\circ$)

Alle Verhältnisse sind Molver.

Die jeweiligen unteren und oberen Knickpunkte entsprechen Punkten auf der soliden und flüssigen Kurve im Phasendiagramm (Abb. 39)

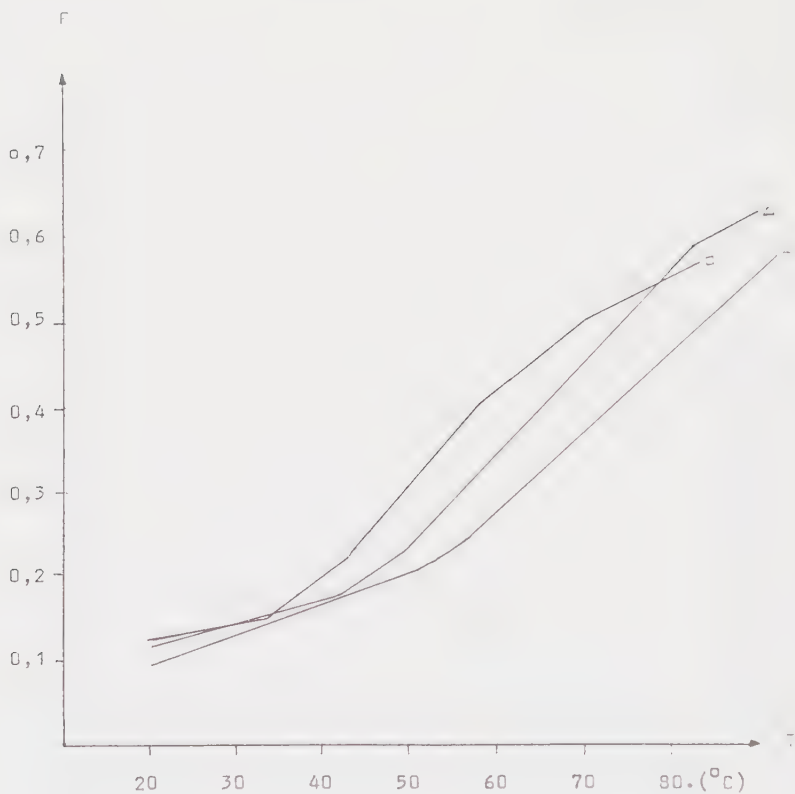


Abb. 38:

Tempo-Verteilungsparameter F als Funktion der Temperatur in Dreiphasensystemen.

Na-LC/DPL = 0,10 + Chol/DPL = 0,40 ($\square$)

Na-LC/DPL = 0,10 + Chol/DPL = 0,60 (Δ)

Na-LC/DPL = 0,10 + Chol/DPL = 0,90 ($\circ$)

Alle Verhältnisse sind Molver.

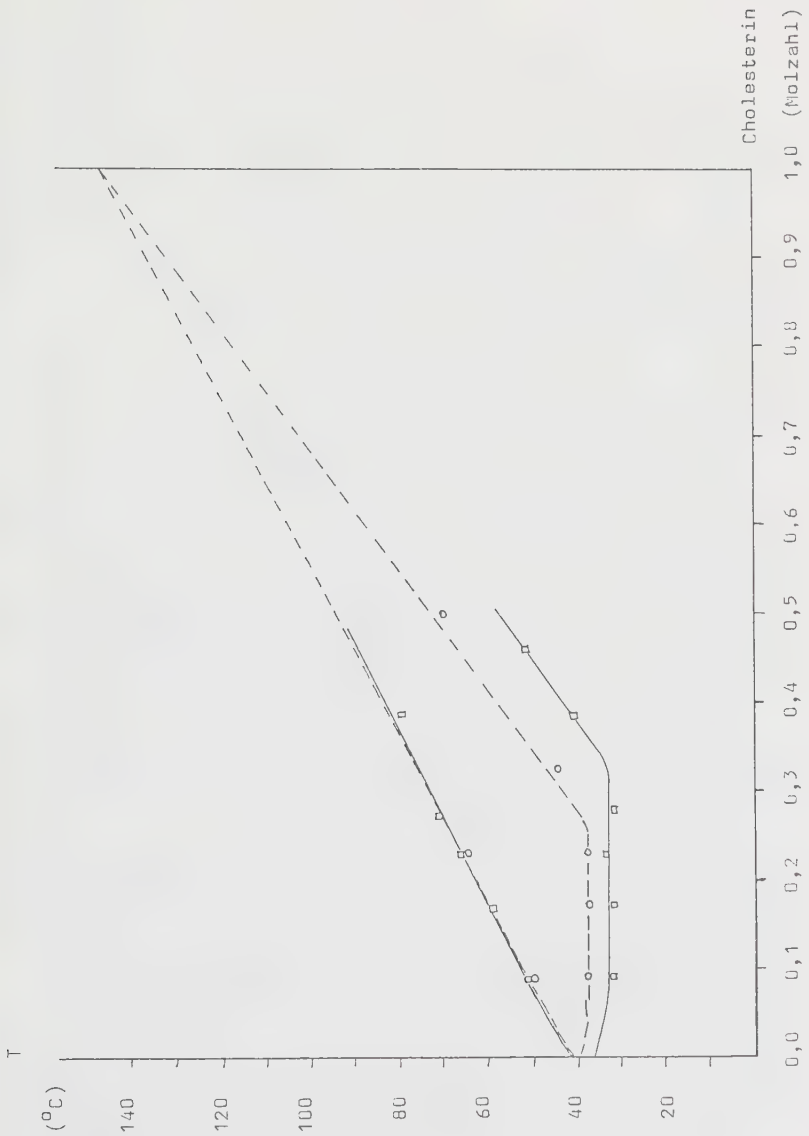


Abb. 39:

Phasendiagramm des Systems Lithocholsäure-Cholesterin-Dipalmitoylphosphatidylcholin ($\square$) und Cholesterin-Dipalmitoylphosphatidylcholin ($\circ$).

VII. Diskussion.

VII.1. Versuche mit Gallensäuremizellen.

Mit Hilfe der Elektronenspinresonanzspektroskopie wurde versucht, die Mizellierung von Taurocholsäure darzustellen. Dazu wurden aus den Spektren die Parameter h_0 , h_{-1} und ΔB entnommen und die Rotationskorrelationszeit T_c für jedes Spektrum berechnet. Der diskontinuierliche Verlauf der T_c gibt den Mizellierungsprozeß als Funktion der Gallensäurekonzentration wieder.

Der T_c -Wert bis rund 3 mmol/l Taurocholsäure entspricht einer Rotationskonstanten, die gemessen wird, wenn 12,3 in TRIS-Puffer gelöst wird. Dies ist auch sehr gut an der Spektrenform zu erkennen (siehe Methode, Abb. 16b).

Der scharfe Anstieg von T_c ab 5 mmol/l Na-TC gibt die Mizellenbildung wieder.

Der relativ flache Verlauf oberhalb 11 mmol/l Na-TC ist nach dieser Methode, die über Beweglichkeit Größe indirekt mißt, der Beweis, daß mit steigenden Gallensäurekonzentrationen nicht die Größe der Mizellen ansteigt, sondern lediglich die Zahl der Mizellen, die mehr oder weniger gleiche Größe besitzen.

Hieraus ist die kritische mizellare Konzentration gut bestimmbar und außerdem der Mizellierungsprozeß mit dieser Methode einfach zu verfolgen.

Die Methode würde sich auch gut dazu eignen, den Einfluß der Ionenstärke und des pH-Wertes auf die Mizellierung darzustellen.

Die verschiedene Größe des Signals hat folgende Ursachen. Die Mizellen können ihrer kleinen Dimension wegen nur eine beschränkte Menge Label aufnehmen. Ob auch wenige Mizellen viele Labelmoleküle aufnehmen können, wurde nicht untersucht, da hiervon das Meßergebnis nicht berührt wird.

Würde eine Mizelle eine große Zahl Labelmoleküle aufnehmen, so würden die meisten von ihnen wegen der geringen Größe

der Mizellen so nahe beieinander liegen, daß ihre Intensität wegen der Austauschwechselwirkung, die viel größer ist als ΔB , sozusagen „verschwinden“ und somit nichts zur Signalgröße beitragen.

VII.1.1. Versuche mit gemischten Mizellen aus Taurocholsäure und Chlorpromazin.

Chlorpromazin verringert konzentrationsabhängig die kritische mizellare Konzentration von Taurocholsäure, indem es mit der Gallensäure gemischte Mizellen bildet. Die Mizellierung beginnt schon bei sehr geringen Gallensäurekonzentrationen (Abb. 26 1mmol/l Chlorpromazin). Die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Substanzen muß sehr stark sein, Rechnet man die Gesamtkonzentration beider Substanzen zusammen (z. B. 1mmol/l CPZ und 3 mmol/l Na-TC) und vergleicht mit 4 mmol/l Na-TC, so unterscheiden sich die T_C -Werte um den Faktor 7. In polarem Medium lagern sich die Taurocholsäuremoleküle mit ihren hydrophoben Seiten aneinander, um einen energetisch ungünstigen Kohlenwasserstoff-Wasser-Kontakt einzelner Moleküle (Monomere) zu verringern. Im submizellaren Bereich werden zuerst Dimere gebildet die sich nach und nach zu größeren Formationen zusammenschließen. Chlorpromazin lagert sich vermutlich mit seinem trizyklischen Grundgerüst in diese Strukturen ein. Die polare Seitenkette verbleibt im wässrigen Medium. Die Einlagerung zwischen die Gallensäuremoleküle muß auch der Grund für die Zunahme der Größe der gemischten Mizellen sein.

Auch die gemischten Mizellen erreichen einen spezifischen Plateauwert, von dem ab sie in der Größe nicht mehr zulegen. Hier scheint ein energetisch günstiges Gleichgewicht zwischen Mizellengröße und Anzahl der Moleküle pro Mizelle erreicht zu sein.

Über den Transport von Pharmaka im Zytosol der Leberzelle ist nichts bekannt. Deshalb lag der Gedanke nahe, ob möglicherweise Gallensäuremizellen als Transportvehikel in Betracht zu ziehen sind. Dies setzt aber voraus, daß diese Pharmaka mit den Gallensäuren wechselwirken, bez. sich mit diesen in irgendeiner Form assoziieren. Da sich auch hier wieder eine Größenveränderung der Mizellen ergibt, kann man mit der Elektronenspinresonanzmethode eine solche Assoziationsmöglichkeit nachweisen.

VII.1.2. Versuche mit Label 12,3 und Chlorpromazin.

Wie oben erwähnt, ist die Größe der Resonanzspektren abhängig von der Menge Label, die in die Mizellen aufgenommen wird. Ein gegenläufiger Effekt kann im submizellaren Bereich nachgewiesen werden. In Abb. 26 können die Spektren der kleinen Gallensäurenkonzentrationen nicht ausgewertet werden, da Chlorpromazin eine zerstörerische Wirkung auf den Label hat und so die Intensität der Signale beeinflusst.

Dieser Zusammenhang wird noch einmal in Abbildung. 27 dargestellt. Da eine chemische Reaktion zwischen Chlorpromazin und 12,3 mit der Folge einer Zerstörung von Label gefunden wurde, war der Verlauf dieser Reaktion von Interesse. Außerdem konnte der Schluß gezogen werden, daß einfache und gemischte Mizellen den Label vor Zerstörung schützen. Das paramagnetische Zentrum des Labels, das die Signale "liefert", kommt auch in den gemischten Mizellen nicht mit Chlorpromazin in Berührung. Dies läßt den weiteren Schluß zu, daß innerhalb der Mizellen keine Diffusion stattfindet.

VII.2. Anwendung der Elektronenspinresonanzspektroskopie auf Gallensäure-Phospholipid-Mischsysteme und deren Beeinflussung durch Chlorpromazin.

Die Elektronenspinresonanzmethode ist neben der Fluoreszenzspektroskopie die einzige Möglichkeit, dynamische, in der Membran ablaufende Prozesse, wie zum Beispiel Molekularbewegungen, darzustellen. Dazu dienen die entsprechenden, in die Membran eingebrachten Sonden, die sehr genau über etwaige Veränderungen in ihrer molekularen Umgebung Auskunft erteilen können. Andere Methoden wie Ultrazentrifugation, Dialyse und Lichtstreuungsmessungen können nur die Parameter Größe, Umfang, und Gesamtmenge erfassen. Sie sind aber nicht geeignet, Verhältnisse innerhalb einer Membran zu beschreiben. Eine Aussage über Konzentrationsverhältnisse und dynamische Prozesse wie Fluiditätsveränderungen in der Membran, ist nicht möglich.

Da im Problemkreis der Cholestase nach Meinung vieler Autoren Wechselwirkungen zwischen den verwendeten Pharmaka und der Lebermembran wichtig sind, sind die Verhältnisse innerhalb der Membran von Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Wechselwirkungen von Chlorpromazin mit Gallensäuren in einem polaren Medium untersucht. Das folgende Kapitel ist der Frage nach der Wechselwirkung von Chlorpromazin mit Gallensäuren in einem apolaren Medium, wie der künstlichen Membran, gewidmet.

Das Hauptinteresse richtet sich auf die canalikuläre Membran. Um überhaupt die Arten der Wechselwirkung zwischen Gallensäuren und Fremdstoffen studieren zu können, wurde eine künstliche Membran aus Dipalmitoylphosphatidylcholin als Grundlage der Untersuchungen ausgewählt. Diese Membran hat verschiedene Vorteile:

1. Sie ist einheitlich in ihrem Aufbau (Länge der Fettsäureketten, Sättigungsgrad).
2. Viele Ergebnisse anderer Forschungsgruppen wurden an dieser Membran erhalten. Außerdem konnten Ergebnisse anderer, hier nicht durchführbarer Methoden, mitdiskutiert werden.

VII.2.1. Versuche mit Gallensäuren-Lipid und Gallensäuren-Chlorpromazin-Lipid-Mischsystemen.

Die Ergebnisse der Versuche mit künstlichen Membranen werden gemeinsam diskutiert.

Wie aus der Abb. 32 ersichtlich ist, beeinflussen sowohl Chlorpromazin, wie auch Taurocholsäure die Phasenumwandlungstemperatur T_U der Lipidmembran in Abhängigkeit von ihrer Konzentration in der Membran. Die Veränderung der T_U wird erreicht, indem sich die Fremdmoleküle in die Membran einlagern und dadurch die Struktur bez. den strengen Aufbau der Membran stören. Erstaunlich ist allerdings der Grad der Störung, der sich in der relativen Veränderung der Phasenumwandlungstemperatur niederschlägt. So ist die durch CPZ bedingte Änderung bei einem Molverhältnis Fremdstoff/DPL = 0,3 um den Faktor 2,5 höher als durch Taurocholsäure.

Durch eine statistische Verteilung von Fremdmolekülen in der Membran wird die Kooperativität der Lipidmoleküle der Membran beeinträchtigt. Kooperativität bedeutet, daß sich Moleküle gemeinsam (je nach Lipid 100 und mehr) "bewegen". Dies ist bedingt durch ihre gleiche Struktur und ihre Packungsdichte. Die Breite der Phasenumwandlung ist ein indirektes Maß für die Kooperativität. Eine statistische Verteilung von Fremdmolekülen zerstückelt gewissermaßen die einzelnen kooperativen Domänen. Die Kompaktheit der Anordnung der Moleküle wird gestört, was zu einer Fluidisierung der Membran (die Moleküle haben mehr Bewegungsfreiheit) führt, die sich wiederum in einer Erniedrigung der Phasenumwandlungstemperatur ausdrückt. Dies scheint bei Chlorpromazin der Fall zu sein.

Taurocholsäure scheint einem anderen Verteilungsmuster zu unterliegen. Die Vermutung liegt nahe, daß Taurocholsäure durch ihre Mizelleneigenschaften in der Lage ist, sich nicht nur in monomerer Form in die Membran einzulagern. Die Einlagerung in Form größerer Strukturen würde eine kleinere Alteration der Membranstruktur bedeuten, die sich wiederum in einer geringeren Änderung der T_U niederschlagen würde. Dies ist offensichtlich der Fall.

Diese Ergebnisse bestätigen auch die Vorstellungen von Mazer, N. A. (1980). Er beschreibt in seinen Versuchen mit Lichtstreuemessungen das Verhalten von Gallensäuren-Lipidmischungen. Danach befinden sich die Gallensäuren als sog. "reversed micelles" in der Lipidmembran, d. h. sie sind mit ihren polaren Seiten zueinandergekehrt und haben mit der apolaren Seite Kontakt mit den Fettsäureketten der Lipidmoleküle.

Verschiedene Autoren beschrieben den "Schutzeffekt" von Taurocholsäure bei der lithocholatinduzierten Cholestase als Fähigkeit der Gallensäure, Mizellen zu bilden und mit dem Cholestatikum Komplexe einzugehen. Auf diese Weise sollte der zytotoxische Effekt von Cholestatika vermindert werden. Diese Schlußfolgerung basierte allerdings auf dem Vergleich zwischen mizellenbildenden und nichtmizellenbildenden Gallensäuren. Leider wurde diese Hypothese bei der chlorpromazininduzierten Cholestase nicht untersucht.

Aus den vorangegangenen Versuchen lassen sich folgende Schlüsse ziehen: Je mehr Taurocholsäure sich bei konstanten Chlorpromazinkonzentrationen in der Membran zusätzlich befindet, umso geringer ist die Verringerung der T_u trotz absolut steigenden Fremdmolekülkonzentrationen in der Lipidmatrix. Die T_u des Molver. CPZ/DPL = 0,3 liegt bei rund $28,5^{\circ}\text{C}$ (Abb. 32). Befindet sich zusätzlich Taurocholsäure in der Membran (Molver. Na-TC = 0,1), steigt die T_u trotz eines höheren Molverhältnisses (Fremdmoleküle/DPL = 0,4) auf rund 31°C an. Ähnlich sind die Verhältnisse bei höheren Taurocholsäurekonzentrationen. (weiterer Anstieg der T_u auf über 32°C , siehe Abb. 33). Bei einem additiven Effekt der Fremdstoffe wäre zu erwarten, daß sich die Veränderungen der T_u addieren. Da sozusagen das Gegenteil geschieht, kann geschlußfolgert werden, daß die durch Chlorpromazin verursachte Störung

der Lipidmatrix durch Taurocholsäure vermindert wird. Dies kann nur heißen, daß Taurocholsäure-Chlorpromazin-aggregate in der Lipidmembran entstehen müssen. Sie sind zwar mit Sicherheit größer als einzelne Moleküle, ihre Anzahl jedoch, muß wesentlich geringer sein als die Zahl der Einzelmoleküle, die durch ihre Verteilung die Struktur der Membran sehr stark beeinflusst. Außerdem weiß man, daß Chlorpromazin und Gallensäuren in wässrigem Medium Präzipitate bilden (Carey, M. C. 1976). Die Bildung von gemeinsamen Gallensäure-Chlorpromazin-Clustern scheint auch in der Lipidmembran möglich zu sein.

Anhang:

Um sicherzustellen, daß die angegebenen Molverhältnisse der Realität entsprechen, wurde fluorimetrisch die Gallensäurekonzentration in den Überständen einiger Präparationen bestimmt. Die Messung weist aus, daß sich max. 2,5% der Gallensäuren nicht in der Lipidmatrix befanden.

Von Chlorpromazin ist ebenfalls bekannt, daß es sich seinem Verteilungskoeffizienten gemäß (Frenzel, J. 1978) im Lipidteil der Membran befinden muß. Dieser Sachverhalt wurde durch optische Absorptionsmessungen im eigenen Institut erhärtet.

VII.3. Phasendiagramm Lithocholsäure-Cholesterin-Dipalmitoylphosphatidylcholin.

Die Lipidzusammensetzung biologischer Membranen ist komplex. Dies ist möglicherweise eine Voraussetzung, um die Funktionalität von Membranproteinen zu erhalten. Membranen, die aus verschiedenen Lipiden bestehen, zeigen oft eine Mosaikstruktur. Das Verhalten dieser Lipidmischungen ist dabei abhängig vom Ausmaß der Ähnlichkeit zwischen den Einzelkomponenten. Erwartungsgemäß mischen sich z. B. Lipide aus Myristoyle Säure und Palmitinsäure in jedem Mischungsverhältnis in der Gel- wie auch in der flüssig-kristallinen Phase, während stark unterschiedliche Lipide z. B. in der kristallinen Phase nicht mischbar sind.

Es stellt sich die Frage, ob derartige Entmischungsvorgänge eine Rolle in der biologischen Funktion natürlicher Membranen spielen. So sind membrangebundene Enzyme in Lebermikrosomen von einem Lipidbereich umgeben, dessen physikalischer Zustand sich wesentlich vom Zustand der Restmembran unterscheidet. Dieser, das Protein unmittelbar umgebende Lipidbereich, zeigt eine Phasenumwandlung oberhalb 32°C , während die restliche Membran oberhalb 0°C schon flüssig-kristallin ist (Stier, A. and Sackmann, E. 1973).

Man vermutet, daß derartige Domänen als Speicherplätze für Fremdmoleküle dienen können. Außerdem könnte an Grenzflächen zwischen solchen Lipidbereichen mit verschiedenen Eigenschaften ein erleichterter Transversaltransport erfolgen.

Nach Kakis, G. und Yousef, I. M. (1978) ist bei lithochalat-induzierter Cholestase eine enorme Anreicherung von Cholesterin und Lithocholsäure in der kanalikulären Membran festzustellen. Der Cholesteringehalt erhöht sich um das Siebenfache, Lithocholsäure um das Doppelte.

Die mittels der Elektronenspinresonanzmethode gewonnenen Phasendiagramme erbrachten das Ergebnis, daß der Lipidteil einer Membran durch die Gegenwart von Lithocholsäure bei höheren Molenbrüchen fluider ist. Fluidität selbst ist aber eine wesentliche Voraussetzung für Fusionsprozesse oder Austauschprozesse zwischen Membranen und z. B. Lipoproteinen.

Wenn eine gewisse Fluidität zu höheren Molenbrüchen erhalten werden kann, scheint dies die Aufnahmefähigkeit der Membran für Cholesterin zu erhöhen.

Da die membranständigen Enzymsysteme, Carriertransportsysteme etc. meistens von der Fluidität der sie umgebenden Lipidmatrix abhängen, bedeutet das hier gefundene Phasenverhalten, daß der die Membran versteifende Einfluß von Cholesterin von Lithocholsäure teilweise kompensiert zu werden scheint. Durch die oben angedeuteten Prozesse vermag die Membran mehr Cholesterin aufzunehmen, bis zu einem Punkt, an dem die Fluidität der Membran nicht mehr für ein normales Funktionieren ausreicht, da die durch Entmischung entstandenen Domänen fester Membranbestandteile überhandgenommen haben müssen.

Möglicherweise ist dieses Phasenverhalten eine auch in der natürlichen Membran ablaufender Teilschritt in der Sequenz der Ereignisse, die schließlich zum Erscheinungsbild der Cholestase führen.

VIII. Zusammenfassung

Die Aufgabe dieser Arbeit war es, die Anwendbarkeit der Elektronenspinresonanzmethode auf die Mizellenbildungseigenschaften von Gallensäuren zu prüfen; außerdem sollte die Wechselwirkung von Taurocholsäure, Chlorpromazin und Lithocholsäure mit Membrankomponenten untersucht und im Hinblick auf die Cholestase diskutiert werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Bildung von Mizellen, d. h. die Bildung höheraggregierter Gallensäuresalze gut durch diese physikalisch-chemische Methode verfolgt und beschrieben werden kann. Dies wurde am Beispiel des Natriumsalzes der Taurocholsäure demonstriert.

Durch Verwendung eines Stearinsäure-spin-labels, der auch mit den Gallensäuremolekülen stark wechselwirkt, erhält man qualitativ und quantitativ zwei verschiedene Resonanzspektren.

Im submizellaren Bereich erscheint ein sog. stark isotropes Spektrum mit einer charakteristischen Korrelationszeit T_c von rund 0,18 nsec; bei einer Gallensäurekonzentration oberhalb der kritischen mizellaren Konzentration entsteht ein schwach isotropes Spektrum, bedingt durch die langsame Beweglichkeit der hochaggregierten und mit Label dotierten Mizellen mit einer T_c von rund 1,5 nsec.

Aus diesen Spektren lassen sich Werte für die kritische mizellare Konzentration und mit Hilfe der Viskosität die Mizellengröße der hier vorliegenden Mizellen bestimmen.

Als Beispiel für den Fremdstoffeinfluß auf die Mizellenbildung wurde Chlorpromazin gewählt.

Es wurde gefunden, daß in Gegenwart von Chlorpromazin und abhängig von dessen Konzentration die Mizellenbildung der Taurocholsäure bei immer geringeren Konzentrationen beginnt, und außerdem die entstehenden Mizellen größer sein müssen, verglichen mit jenen, die in Abwesenheit von Chlorpromazin entstehen. Daraus folgt:

Chlorpromazin und Taurocholsäure, die beide in Wasser hervorragend löslich sind, müssen auch in diesem Medium eine starke intermolekulare Wechselwirkung ausüben, wobei sie eine Art Komplex-

bildung eingehen. Ob eine analoge Aggregation auch in einem nicht polaren Medium stattfindet und nachgewiesen werden könnte, war Gegenstand weiterer Untersuchungen dieser Arbeit.

Dazu wurde die Fluidität von Dipalmitoylphosphatidylcholin-Liposomen - gemessen an ihrer Phasenumwandlungstemperaturen T_U - mit Chlorpromazin, Taurocholsäure und einer Mischung aus beiden konzentrationsabhängig verändert.

Chlorpromazin erniedrigt die Phasenumwandlungstemperatur etwa doppelt so stark wie Taurocholsäure, wegen höchstwahrscheinlicher Dimerenbildung innerhalb der Lipidmatrix. Interessanterweise setzt sich die Fluidität der Dreikomponentenmischung nicht aus der Fluidität der beiden Zweikomponentenmischungen zusammen, was bei statistischer Verteilung von Chlorpromazin und Taurocholsäure in der Membran zu erwarten wäre.

Da über optische Absorptions- und Fluoreszenz-Messungen nachgewiesen wurde, daß sich beide Molekülarten nicht gegenseitig aus den Liposomen verdrängen, ist anzunehmen, daß sich beide Substanzen auch in den Liposomen zu Aggregaten zusammenlagern und dadurch eine Fluiditätserniedrigung resultiert.

Dies könnte für die chlorpromazininduzierte Cholestase von besonderer Bedeutung sein, da hierbei Membranveränderungen gefunden wurden, die geeignet sind, die Funktionsweise von Carrierproteinen, worauf die Gallensäuresekretion beruhen soll, zu behindern.

Auch die Lithocholsäure vermag, insbesondere beim Tier, eine Cholestase hervorrufen. Charakteristisch für diese Form der Cholestase ist, wie Versuche an der Ratte gezeigt haben, eine starke Anreicherung von Cholesterin in der kanalikulären Membran der Leber.

Unter Verwendung des Tempo-spin-labels wurden Phasendiagramme der Systeme Cholesterin-Dipalmitoylphosphatidylcholin und Lithocholsäure-Cholesterin-Dipalmitoylphosphatidylcholin erstellt.

Die Anwesenheit von Lithocholsäure erweiterte den Bereich der Mischphase, in denen auskristallisierte neben fluiden Domänen koexistieren, nach tieferen Temperaturen und höheren Cholesterin-

konzentrationen, d. h. die Cholesterinwirkung wird durch Lithocholsäure modifiziert, so daß der mengenmäßige Anteil fluider Bereiche vergrößert wird.

Da davon ausgegangen werden kann, daß nur fluide Membranteile in Fusion- und Austauschprozesse involviert sind, bedeutet dieses Ergebnis möglicherweise erhöhte Aufnahmefähigkeit der hier untersuchten Modellmembran für den Einbau von Cholesterin.

Summary.

"Application of the Electron Spin Resonance spectroscopy on the micellisation properties of Cholic Acid and their relation to the pharmacological-induced cholestasis"

The intention of this work has been, to proof the application of the electron spin resonance method regarding the property of bile acids to form micelles; furthermore the interaction of taurocholic acid and lithocholic acid with other membrane components should be investigated and its special concern with cholestasis discussed.

It has been shown, that the formation of bile salt micelles could be described satisfactorily by this physical-chemical method. This has been demonstrated using taurocholic acid. Stearic spin label yields two qualitatively and quantitatively different spectra. In the submicellar region a strongly isotropic spectrum is found, characterized by a correlation time τ_c of 0,18 nsec. In the micellar region a weakly isotropic spectrum is observed with a τ_c of 1,5 nsec; this is due to the slower mobility of the high molecular micelles with integrated spin label.

From this spectra the critical micellar concentration and with known viscosity the micellar size can be estimated.

As an example of the influence of foreign substances chlorpromazine hydrochloride, a cholestasis inducing drug has been applied. The following has been found:

Chlorpromazine shifts the critical micellar concentration of taurocholic acid to lower bile salt concentrations, and further the resulting mixed micelles will be larger in the presence of chlorpromazine.

This implies a rather strong intermolecular interaction between chlorpromazine and taurocholic acid in aqueous medium with some sort of complex formation, besides the fact that both are excellently soluble in water.

It has been the question if similar aggregation between both will occur in non-polar medium which is found in biological membranes. In order to find out this following mixtures have been investigated:

Dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing either chlorpromazine or taurocholic acid or both of them.

In all cases the fluidity monitored by the phase transition temperature varies with kind of mixture and the concentration ratios.

Chlorpromazine lowers the phase transition temperature about twice as much as taurocholic acid does, which can be explained by the formation of taurocholic acid dimers within the lipid matrix.

The fluidity of the three component-mixture (CPZ-Na-TCA-DPPC) is not found to be composed additively of the individual fluidities of the two two-component mixtures (CPZ-DPPC; Na-TCA-DPPC). This has to be expected if the two substances would be distributed within the liposomes statistically (in a random way). From optical absorption and fluorescence measurements it has been learned that both chlorpromazine and taurocholic acid will not exclude each other, if they are incorporated within the liposomes simultaneously. Hence we may assume that in liposomes, too, the two substances will form some sorts of aggregates, which as a consequence will result in a reduction of the fluidity as has been detected.

This could be of importance for the chlorpromazine-induced cholestasis. Here membrane changes have been reported to handicap the normal function of bile salt carriers.

Especially in animals lithocholic acid cholestasis is found. Here a strong accumulation of cholesterol within the canalicular membrane appears to be typical for this form of cholestasis. The use of Tempo spin label allowed to construct phase diagrams of the two mixtures dipalmitoylphosphatidylcholine and cholesterol, and dipalmitoylphosphatidylcholine, cholesterol and lithocholic acid.

In the presence of lithocholic acid the coexistence region (fluid and solid domains) will be extended towards lower

temperatures and higher cholesterol concentrations. This means, the influence of lithocholic acid leads to a coexistence region, more rich in fluid domains.

Since it can be assumed, that fusion and exchange processes will be facilitated by fluid membrane domains our result possibly implies an enhanced uptake mechanism for cholesterol regarding this liposomal membrane.

IX. Literaturverzeichnis.

1. Abbeiger, H., Buscher, H. P., Gerok, W., Kramer, W.,
Kurz, G.:
Identity of bile acid conjugating enzymes.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359:251 (1978)
2. Adinolfi, L. E., Utili, R., Gaeta, G. B., Abernathy, C. O.
Zimmerman, H. J.:
Cholestasis induced by estradiol-17 -D-glucuronide:
Mechanisms and prevention by sodium taurocholate.
Hepatology Vol. 4 No. 1, 30-37 (1984)
3. Adler, R. D., Wannagat, F. J., Ockner, R. D.:
Bile secretion in selective biliary obstruction: Adaption
of taurocholate transport maximum to increased secretory
load in the rat.
Gastroenterology, 73: 129-136 (1977)
4. Anwer, M. S., Kroker, R., Hegner, D.:
Effect of albumin on bile acid uptake by isolated rat
hepatocytes. Is there a common bile acid carrier?
Biochem. Biophys. Res. Com. 73: 63-71 (1976a)
5. Anwer, M. S., Engelking, L. R., Gronwall, R., Klentz, R. A.:
Plasma bile acid elevation following CCl_4 induced liver
damage in dogs, sheeps, calves, and ponies.
Res. Vet. Sci. 20: 127-130 (1976b)
6. Anwer, M. S., Kroker, R., Hegner, D., Petter, A.:
Cholic acid binding to isolated rat liver plasma membranes.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 358: 543-553 (1977)
7. Anwer, M. S., Hegner, D.:
Effect of Na^+ on bile acid uptake by isolated rat hepato-
cytes.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie (1978)
8. Anwer, M. S.:
Untersuchungen zum Mechanismus der Gallebildung und der
pharmakainduzierten Cholerese.
Habilitationsschrift aus dem Fachbereich der Tiermedizin-
ischen Fakultät der Universität München. (1980)

9. Berliner, L. J.:
Spin Labeling. Theory and Application.
Academic Press. New York (1976)
10. Barnhart, J. L., Combes, B.:
Characterization of SC-2644 induced choleresis in the dog.
Evidence for canalicular bicarbonate secretion.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 206: 190-197 (1978)
11. Berthelot, P., Erlinger, S., Dhumeaux, D., Preaux, A. M.:
Mechanism of phenobarbital-induced hypercholeresis in
the rat.
Am. J. Physiol. 219: 809-813 (1970)
12. Bonvicini, F., Gautier, A., Gardiol, D., Borel, G. A.:
Cholesterol in acute cholestasis induced by tauroolitho-
cholic acid.
Lab. Invest. 38: 487-495 (1978)
13. Borochoy, H., Abbott, R. E., Schachter, D.:
Modulation of erythrocyte membrane proteins by membrane
cholesterol and lipid fluidity.
Biochemistry 18: 251-255 (1979)
14. Boyer, J. L.:
Bile formation in the isolated perfused rat liver.
Am. J. Physiol. 221: 1156-1163 (1971)
15. Boyer, J. L.:
Bile secretion and the pathogenesis of cholestasis. View-
points of digestive digestive diseases.
Vol. 10, 264-267 (1978)
16. Brasitus, T. A., Schachter, D., Mamounas, T. G.:
Functional interactions of lipids and proteins in rat
intestinal microvillus membranes.
Biochemistry 18: 4136-4144 (1979)
17. Brasitus, T. A., Schachter, D.:
Lipid dynamics and lipid-protein interactions in rat
enterocyte basolateral and microvillus membranes.
Biochemistry 19: 2763-2769 (1980)

18. Brauer, R. W.:
Mechanisms of bile formation.
JAMA 169: 1462-1466 (1959)
19. Carey, M. C., Small, D. M.:
Micelle formation by bile salts. Physical-chemical and thermodynamic considerations.
Arch. Intern. Med. 130: 506-527 (1972)
20. Carey, M. C., Small, D. M.:
Micelle formation by bile salts. Physical-chemical and thermodynamic considerations.
Arch. Intern. Med. 130: 506-527 (1972)
21. Carey, M. C., Hirom, P. C., Small, D. M.:
A study of the physico-chemical interactions between biliary lipids and chlorpromazine hydrochloride.
Biochem. J. 153: 519-531 (1976)
22. Carey, M. C.:
Lipases, bile salts and fat digestion: New insights.
Ital. J. Gastroenterol. 12: 140-145 (1980)
23. Coleman, R., Lowe, P. J., Billington, D.:
Membrane lipid composition and susceptibility to bile salt damage.
Biochim. Biophys. Acta 599: 294-300 (1980)
24. Cooper, R. A., Durocher, J. R., Leslie, M. H.:
Decreased fluidity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia.
J. Clin. Invest. 60: 115-121 (1977)
25. Cooper, R. A., Leslie, M. H., Fishcoff, S., Shinitzky, M., Shattil, S. J.:
Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes in vitro: Production of red cell possessing more than two cholesterol per phospholipid.
Biochemistry 17: 327-331 (1978)
26. Cowen, A. E., Campbell, C. B.:
Bile salt metabolisms. I. The physiology of bile salts.
II. Bile salts and disease.
Aust. N. Z. J. Med. 7: 579-595 (1977)

27. Davis, R. A., Kern, F., Showalter, R., Sutherland, E.,
Sinesky, M., Simon, F. R.:
Alterations of hepatic Na-K-ATPase and bile flow by estrogens:
Effect on liver surface membrane lipid structure and function.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4130-4134 (1978)
28. Dowling, R. H., Mack, E., Picott, J., Berger, J., Small,
D. M.:
Experimental model for the study of the enterohepatic
circulation of bile in the rhesus monkeys.
J. Lab. Clin. Med. 72: 169-176 (1968)
29. Elias, E., Boyer, J. L.:
Chlorpromazine and its metabolites alter polymerization
and gelation of actin.
Science 206: 1404-1406 (1979)
30. Elias, E., Hruban, Z., Wade, J. B., Boyer, J. L.:
Phalloidin-induced cholestasis: A microfilament-mediated
change in junctional complex permeability.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2229-2233 (1980)
31. Erlinger, S., Dhumeaux, D.:
Mechanisms and control of secretion of bile water and
electrolytes.
Gastroenterology 66: 281-304 (1974)
32. Erlinger, S.:
Bile acid independent secretion. In: Liver and Bile.
ed. by L. Bianchi, W. Gerok, and K. S. Sickinger 55-62
(1977)
33. Erlinger, S.:
Hepatocyte bile secretion: Current views and controversies.
Hepatology 1: 352-359 (1981)
34. Forker, E. L.:
The effect of estrogen on bile formation in the rat.
J. Clin. Invest. 48: 654-663 (1969)
35. Forker, E. L.:
Mechanisms of hepatic bile formation.
Ann. Rev. Physiol. 39: 323-347 (1977)

36. Frenzel, J., Arnold, K., Nuhn, P.:
Calorimetric, ^{13}C NMR and ^{31}P NMR studies on the interaction of some phenothiazine derivates with dipalmitoyl phosphatidyl choline model membranes.
Biochem. Biophys. Acta 507: 185-197 (1978)
37. Gerok, W., Matern, S.:
Pathogenetische Bedeutung der Gallensäuren.
Klin. Wochenschr. 59: 575-589 (1981)
38. Graf, J., Korn, P., Peterlik, M.:
Choleretic effects of quabain and ethacrynic acid in the isolated perfused rat liver.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm. Exp. Pathol. 272: 230-233 (1972)
39. Graf, J., Peterlik, M.:
Quabain-mediated sodium uptake and bile formation by isolated perfused rat liver.
Am. J. Physiol. 230: 876-885 (1978)
40. Grisham, C. M., Barnett, R. E.:
The interrelationship of membrane and protein structure in the functioning of the (Na-K) activated ATPase.
Biochim. Biophys. Acta 266: 613-624 (1972)
41. Gumucio, J. J., Valdivieso, V. D.:
Studies on the mechanisms of ethinylestradiol impairment of bile flow and bile salt secretion in the rat.
Gastroenterology 61: 339-344 (1971)
42. Gumucio, J. J., Miller, D. L.:
Functional implication of liver cell heterogeneity.
Gastroenterology 80: 393-403 (1981)
43. Hardison, W. G. M., Wood, C. A.:
Importanse of bicarbonate in bile salt independant fraction of bile flow.
Am. J. Physiol., 235: E158-E164 (1978)
44. Hargreaves T.:
Cholestatic drugs and bilirubin metabolism.
Nature 206: 154 (1965)

45. Haslewood, G. A. D.:
Bile salts.
London, England, Methnen and Co., Ltd, (1967)
46. Hauser, H., Phillips, M. C.:
Interaction of polar groups of phosphorlipid bilayer membranes.
Prog. Surf. Memb. Sci. 13:297-303 (1979)
47. Hayes, J. D., Strange, R. C., Percy-Robb, I. W.:
Identification of two lithocholic acid-binding proteins.
Separation of liganding from glutathione S-transferase
B. Biochem. J. 181: 699-708 (1979)
48. Heaton, K. W.:
Bile salts.
in: Liver and biliary disease, Hrsg.: Wright, K. G. M. M.,
Kavran, S., Millward-Sadler, G. H., W. B. Saunders Company,
London, Philadelphia, Toronto, 233-254 (1979)
49. Hinz, H.-J., Sturtevant, J. M.:
Calorimetric studies of dilute aqueous suspension of
bilayers formed from synthetic L- α -lecithins:
J. Biol. Chem. 247: 6071 (1972)
50. Hofmann, A. F., Small, D. M.:
Detergent properties of bile salts: Correlation with
physiological function.
Ann. Rev. Med., 18: 333-376 (1967)
51. Hofmann, A. F.:
The enterohepatic circulation of bile acids in man.
Bile acids. Clinics in Gastroenterology, Vol. 6, edited
by G. Paumgartner, 3-24, Saunders, Philadelphia, (1977)
52. Hruban, Z., Tavaloni, N., Reed, J. S.:
Ultrastructural changes during cholestasis induced by
chlorpromazine in the isolated perfused rat liver.
Virchows Arch (Zellpath) 26: 289-305, (1978)
53. Hubbell, W. L., Mc Connell, H. M.:
Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes.
J. Am. Soc. 93: 314 (1971)

54. Igimi, H., Carey, M. C.:
pH-solubility relations of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids. Physical-chemical basis for dissimilar solutions and membrane phenomena.
J. Lipid Res. 21: 72-90 (1980)
55. Igimi, H., Carey, M. C.:
Cholesterol gallstone dissolution in bile: Dissolution kinetics of crystalline Cholesterol with chenodeoxycholate, ursodeoxycholate, and their glycine and taurine conjugates.
J. Lipid Res. 22: 254-270 (1981).
56. Inoue, M., Kinne, R., Tran, T., Arias, I. M.:
Taurocholate transport by rat liver sinusoidal membrane vesicles: Evidence of sodium cotransport.
Hepatology Vol. 2 No. 5, 572-579 (1982)
57. Inoue, M., Kinne, R., Tran, T., Arias, I. M.:
Taurocholate transport by rat liver canalicular membrane vesicles.
J. Clin. Invest. 73: 659-663 (1984)
58. Ishak, K. G., Irey, N. S.:
Hepatic injury associated with phenothiazines.
Arch. Pathol. 93: 283 (1972)
59. Javitt, N. B., Emerman, S.:
Effect of sodium tauroolithocholate on bile flow and bile acid excretion.
J. Clin. Invest. 47: 1002-1014 (1968)
60. Jürgens, E., Höhne, G.:
Calorimetric study of the dipalmitoylphosphatidylcholin-water phase diagram.
Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 87: 95-104 (1983)
61. Kakis, G., Yousef, I. M., Fischer, M. M.:
Studies on the binding of the bile salts by plasma proteins.
Gastroenterology 72: 1178 (1977)

62. Kakis, G., Yousef, I. M.:
Pathogenesis of lithocholate- and taurolithocholate- induced
intrahepatic cholestasis in rats.
Gastroenterology 75: 595-607 (1978)
63. Kakis, G., Yousef, I. M.:
Mechanism of cholic acid protection in lithocholate-induced
intrahepatic cholestasis in rats.
Gastroenterology 78: 1402-1411 (1980)
64. Keefe, E. B., Scharschmidt, E. F., Blankenship, N. M.,
Ockner, R. K.:
Studies of the relationships among bile flow, liver plasma
membrane Na-K-ATPase, and membrane viscosity in the rat.
J. Clin. Invest. 64: 1590-1598 (1979)
65. Keefe, E. B., Blankenship, N. M., Scharschmidt, E. F.:
Alteration of rat liver plasma membrane fluidity and ATPase
activity by chlorpromazine hydrochloride and its metabolites.
Gastroenterology 79: 222-231 (1980)
66. Kimmelberg, H. K., Paphadjopoulos, D.:
Effect of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions
and cholesterol on Na-K-stimulated adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem. 249: 1071-1080 (1974)
67. King, J. E., Schönfield, L. J.:
Cholestasis induced by sodium taurolithocholate in isolated
hamster liver.
J. Clin. Invest. 50: 2305-2312 (1971)
68. Kivelson, D. J.:
Theory of EPR line widths of free radicals.
J. Chem. Phys. 33: 1093-1106 (1960)
69. Klaassen, C. D.:
Studies on the increased biliary flow produced by pheno-
barbital in rats.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 176: 743-751 (1971)

70. Kramer, W.:
Die Identifizierung gallensäurebindender Polypeptide
durch Photoaffinitätsmarkierung.
Inaugural-Diss. Freiburg (1981)
71. Kreek, M. J., Petersen, M. E., Sleisinger, M. H., Jeffries,
G. H.:
Effects of ethinylestradiol-induced cholestasis on bile
flow and bile excretion of estradiol glucuronide by the
rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131: 646-650 (1969)
72. Kroker, R.:
Liver and Aging, S. 127-134
4th International Giessener Symposium on Experimental
Gerontology, Sonderdruck, Hrsg. D. Platt, Verlag F. K.
Schattauer (1977)
73. Ladbroke, B. D., Chapman, D.:
Thermal analysis of lipids, proteins, and biological mem-
branes. A review and summary of recent studies.
Chem. Phys. Lipids 3:304 (1969)
74. Latham, P. S., Kashgarian, M.:
The ultrastructural localization of transport ATPase in the
rat liver at non bile canalicular plasma membranes.
Gastroenterology 76: 988-996 (1979)
75. Layden, T. J., Boyer, J. L.:
Scanning electron microscopy of the rat liver. Studies of
the effect of tauroolithocholate and other models of chole-
stasis.
Gastroenterology, 69: 724-738 (1975)
76. Layden, T. J., Boyer, J. L.:
Tauroolithocholate-induced cholestasis. Taurocholate, but
not dehydrocholate reverses cholestasis and bile canalicular
injury.
Gastroenterology 73: 120-128 (1977)
77. Layden, T. J., Elias, E., Boyer, J. L.:
Bile formation in the rat. The role of aparacellular shunt
pathway.
J. Clin. Invest. 62: 1375-1385 (1978)

78. Lee, A. G., Birdsall, N. J. M., Metcalve, J. C., Toon, P. A., Warren, G. B.:
Clusters in lipid bilayers and the interpretation of thermal effects in biological membranes.
Biochem 13: 3699 (1974)
79. Lee, A. G.:
Functional properties of biological membranes.
Progr. Biophys. Mol. Biol. 29: 1-55 (1975)
80. Lee, A. G.:
Lipid Phase transitions and phase diagrams.
Biochem. Biophys. Acta 472: 237-281 (1977)
81. Levine, Y. K., Lee, A. G., Birdsall, N. J. M., Metcalve, J. C., Robinson, J. D.:
The interaction of paramagnetic ions and spin labels with lecithin bilayers.
Biochim. Biophys. Acta 291: 592 (1973)
82. Lippert, J. L., Peticolas, W. L.:
Raman active vibrations in long-chain fatty acids and phospholipid sonicates.
Biochim. Biophys. Acta 282: 8 (1972)
83. Livingstone, C. J., Schachter, D.:
Calcium modulates the lipid dynamics of rat hepatocyte plasma membranes by direct and indirect mechanisms.
Biochemistry 19: 4823-4827 (1980)
84. Luzzati, V.:
X-ray diffraction studies of lipid-water systems.
In Biological Membranes (ed. Chapman, D.) Academic Press London (1968)
85. Marsh, D., Watts A., Knowles, P. F.:
Cooperativity of the phase transition in single- and multibilayer lipid vesicles.
Biochem. et Biophys. Acta 465: 500-514 (1977)
86. Mashige, Y., Imai, K., Osuga, T.:
A simple and sensitive assay of total serum bile acids.
Clin. Chim. Acta 70: 79-86 (1976)

87. Matern, S., Gerok, W.:
Pathophysiology of the enterohepatic circulation of bile acids.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 85: 125-204 (1979)
88. Mazer, N. A., Carey, M. C., Kwasnick, R. F., Benedek, G. B.:
Quasielastic light scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Size, shape, and thermodynamics of bile salt micelles.
Biochemistry 18: 3064-3075 (1979)
89. Mazer, N. A., Benedek, G. B., Carey, M. C.:
Quasielastic light scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithine solutions.
Biochemistry 19: 601-615 (1980)
90. Mazer, N. A., Schurtenberger, P., Kanzig, W., Carey, M. C., Preisig, R.:
Quasielastic light scattering studies of native dog bile-comparison with model systems.
Gastroenterology 80: 1341 (Abstr.) (1981)
91. Mazer, N. A., Benedek, G. B., Carey, M. C.:
Micellisation, solubilisation and microemulsions in aqueous biliary lipid systems.
In: Solution Behaviour of Surfactants-Theoretical and Applied Aspects, ed. by E. J. Fendler and K. L. Mittal, Plenum New York (1982)
92. McConnell, H. M., McFarland, B.:
Physics and chemistry of spin labels.
Quarterly Reviews of Biophysics 3: 91-136 (1970)
93. Meier, P. J., Sztul, E. S., Reuben, A., Boyer, J. L.:
Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane. Vesicles isolated in high yield from rat liver.
J. Cell. Biol. 98: 991-1000 (1984)
94. Melchior, D. L., Morowitz, H. J.:
Dilatometry of dilute suspensions of synthetic lecithin aggregates.
Biochem. 11: 4558 (1972)

95. Miyai, K., Price, V. M., Fisher, M. M.:
Bile acid metabolism in mammals: Ultrastructural studies on the intrahepatic cholestasis induced by lithocholic and chenodeoxycholic acid in the rat
Laboratory Investigation 24/4: 292-302 (1971)
96. Miyai, K., Mayr, W. M., Richardson, A. L.:
Acute cholestasis induced by lithocholic acid in the rat. A freeze fracture replica and thin section study.
Lab. Invest. 32/4: 527-535 (1975)
97. Miyai, K., Richardson, A. L., Mayr, W. M., Javitt, N. B.:
Subcellular pathology of rat liver in cholestasis and choleresis induced by bile salts. ;. Effects of lithocholic, 3 β -Hydroxy-5 cholenic, Cholic and Dehydrocholic acids.
Laboratory Investigation 36/3: 249-258 (1977)
98. Mok, H. Y. I., von Bergmann, K., Grundy, S. M.:
Regulation of pool size of bile acids in man.
Gastroenterology 73: 684-690 (1977)
99. Nemchausky, B. A., Layden, T. J., Boyer, J. L.:
Effects of chronic choleretic infusions of bile acids on the membrane of the bile canaliculus. A biochemical and morphological study.
Lab. Invest. 36: 259- 267 (1977)
100. Northfield, T. C., Hofmann, A. F.:
Biliary lipid output during three meals and an overnight fast. Relationship to acid pool size and cholesterol saturation of bile in gallstone and control subjects.
Gut 16: 1-11 (1975)
101. Oda, M., Phillips, M. J.:
Bile canaliculus membrane pathology in cytochalasin B induced cholestasis.
Lab. Invest. 37: 350- 356 (1977)

102. O'Maille, E. R. L., Richards, T. G., Short, A. H.:
Acute taurine depletion and maximal rates of hepatic conjugation and secretion of cholic acid in the dog.
J. Physiol. (Lond.) 180: 67-79 (1965)
103. Palmer, R. H.:
Bile acid sulfates. II. Formation, metabolism, and excretion of lithocholic acid sulfates in the rat.
J. Lip. Res. 12: 680-687 (1971)
104. Palmer, R. H.:
Bile acids, liver injury and liver disease.
Arch. Int. Med. 130: 606-617 (1972)
105. Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Nir, S., Isac, T.:
Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol.
Biocim. Biophys. Acta 311: 33B (1973)
106. Paumgartner, G., Herz, R., Sauter, K., Schwarz, H. P.:
Taurocholate excretion and bile formation in the isolated perfused rat liver.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 285: 165-174 (1974)
107. Paumgartner, G., Reichen, J., v. Bergmann, K., Preisig, R.:
Elaboration of hepatocytic bile.
Bull. N. Y. Acad. Med. 51: 455-471 (1975)
108. Paumgartner, G.:
Physiology of bile secretion. Bile acid-dependent flow.
In: *Liver and Bile*, ed. by L. Bianchi, W. Gerok and K. Sickinger, 45-63, Lancaster, Plenum Press (1977)
109. Perez, V., Gorodisch, S.:
Female sex hormones and the liver.
In: *The liver and diseases*, eds. Schaffner, F., Sherlock, S., Leevy, C. M., Intercont. Med. Book Corp. N. Y. (1974)

110. Peterson, R. E., Fuimoto, J. M.,
Increased biliary tree permeability produced in rats
by hepatoactive agents.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 202: 732-739 (1977)
111. Philipps, M. J., Oda, M., Mak, E., Fisher, M. M., Jeejeehoy,
H. N.:
Microfilament dysfunction as a possible cause of intra-
hepatic cholestasis.
Gastroenterol. 69: 48-58 (1975)
112. Plaa, G. L., Priestly, B. G.:
Intrahepatic cholestasis induced by drugs and chemicals.
Pharmacol. Rev. 28: 207-273 (1977)
113. Popper, H., Schaffner, F.:
Drug induced hepatic injury.
Ann. Intern. Med. 51: 1230-1251 (1959)
114. Popper, H., Schaffner, F.:
Pathophysiology of cholestasis.
Human. Pathol. 1: 1-24 (1970)
115. Popper, H.:
Cholestasis.
Acta. Hepatol. Japonica. 19/10: 929-933 (1978)
116. Poupon, R. E., Poupon, R. Y., Dumont, M., Erlinger, S.:
Hepatic storage and biliary transport maximum of tauro-
cholate and taurochenodeoxycholate in the dog.
Eur. J. Clin. Invest. 6: 431-437 (1976)
117. Preisig, R., Cooper, H. L., Wheeler, H. O.:
The relationship between taurocholate secretion rate and
bile production in the unanesthetized dog during cholinergic
blockade and during secretin administration.
J. Clin. Invest. 41: 1152-1162 (1962)
118. Reichen, J. J., Paumgartner, G.:
Kinetics of taurocholate uptake by the perfused rat liver.
Gastroenterology 69:132-136 (1975)
119. Reichen, J., Paumgartner, G.:
Uptake of bile acids by perfused rat liver.
Am. J. Physiol. 231: 734-742 (1976)

120. Reichen, J., Faumgartner, G.:
Relationship between bile flow and Na-K-ATPase in liver plasma membranes enhanced in bile canaliculi.
J. Clin. Invest. 60: 429-434 (1977)
121. Reichen, J., Berk, P. D.:
Isolation of organic anion binding protein from rat liver plasma membrane fractions by affinity chromatography.
Biochim. Biophys. Res. Com. 91: 484-489 (1979)
122. Reichen, J., Berman, M. D., Berk, P. D.:
The role of microfilaments and of microtubules in taurocholate uptake by isolated rat liver cells.
Biochim. Biophys. Acta 643: 126-133 (1981)
122. Ros, E., Carey, M. C.:
Effects of chlorpromazine hydrochloride on bile flow, bile salt synthesis, and biliary lipid secretion in the primate. In: Bile acid metabolism in health and disease, eds. G. Faumgartner, A. Stiehl, pp. 219-227, MTP Press, Lancaster (1972)
123. Ros, E., Small, D. M., Carey, M. C.:
Effects of chlorpromazine hydrochloride and its metabolites on Mg- and Na-K-ATPase activities of canalicular enriched rat liver plasma membranes.
Gastroenterology 74: 1183-1190 (1979)
124. Sackmann, E.:
Dynamische Struktur von Lipiddoppelschichten und biologischen Membranen. Untersuchungen mit Radikalsonden.
In: Biophysik, Hrsg.: W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler. Springer Verlag, Berlin (1977)
125. Samuels, A. M., Carey, M. C.:
Effects of chlorpromazine hydrochloride and its metabolites on Mg- and Na-K-ATPase activities of canalicular enriched rat liver plasma membranes.
Gastroenterology 74: 1183-1190 (1978)
126. Schachter, D.:
Fluidity and function of hepatocyte plasma membranes.
Hepatology Vol. 4 No. 1 pp. 140-151 (1984)

127. Schaffner, F., Javitt, N. B.:
Morphologic changes in hamster liver during intrahepatic
cholestasis induced by tauroolithocholate.
Lab. Invest. 15: 1783-1792 (1966)
128. Schaffner, F., Popper, H.:
Cholestasis is the result of hypoactive hypertrophic smooth
endoplasmatic reticulum in the hepatocyte.
Lancet ii: 355-359 (1969)
129. Schaffner, F., Popper, H.:
Classification and mechanisms of cholestasis.
in: Liver and biliary disease, eds. Wright, K. G. M. M.,
Warren, S., Millward-Sadler, G. H., Saunders, W. B. Company,
London, Philadelphia, Toronto 296-323, (1979)
130. Scharschmidt, B. F., Keefe, E. B., Blankenship, N. M.,
Ockner, R. K.:
Taurocholate: a rapid regulator of canalicular membrane
ATPase activity.
Gastroenterology 74: 1167 (1978)
131. Scharschmidt, B. F., Keefe, E. B., Vessey, D. A., Blanken-
ship, N. M., Ockner, R. K.:
In vitro effect of bile salts on rat liver plasma membrane
fluidity and ATPase activity.
Hepatology 1: 137-145 (1981)
132. Scheffler, K., Stegmann, H. B.:
Elektronenspinresonanz
Springer Verlag, Berlin 1970
133. Schiff, E. R., Small, N. C., Dietschy, J. M.:
Characterization of the kinetics of the passive and active
transport mechanisms for bile acid absorption in the small
intestine and colon of the rat.
J. Clin. Invest. 51: 1351-1362 (1972)
134. Schoffa, G.:
Elektronenspinresonanz in der Biologie.
G. Braun, Karlsruhe (1964)

135. Schwarz, L. R., Burr, R., Schwenk, M., Pfaff, E., Greim, H.:
Uptake of taurocholic acid into isolated rat liver cells.
Eur. J. Biochem. 55: 617-623 (1975)
136. Schwarz, L. R., Schwenk, M., Pfaff, E., Greim, H.:
Excretion of taurocholate from isolated hepatocytes.
Eur. J. Biochem. 71: 379-377 (1975)
137. Sharma, J. N., Prasad, C. R.:
Effects of chlorpromazine on the bile secretion in dogs.
Indian J. Med. Res. 55: 258-260 (1967)
138. Shimshick, E. J., Mc Connell, H. M.:
Lateral phase separations in phospholipid membranes.
Biochemistry 12: 2351-2360 (1973a)
139. Shimshick, E. J., Mc Connell, H. M.:
Lateral phase separations in binary mixtures of cholesterol
and phospholipids.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 53,2: 446-451 (1973b)
140. Shinitzky, M., Barenholz, Y.:
Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization.
Biochim. Biophys. Acta 515: 367-394 (1978)
141. Shinitzky, M., Henkart, P.:
Fluidity of cell membranes: Current concepts and trends.
Int. Rev. Cytol. 60: 121-147
142. Simon, F. R., Arias, I. M.:
Alteration of bile canalicular enzymes. a possible cause of
bile excretory failure.
J. Clin. Invest. 57: 765-775 (1973)
143. Simon, F. R., Sutherland, E., Accatino, L., Vial, J.,
Mills, D.:
Studies on drug-induced cholestasis: Effect of ethinyl
estradiol on hepatic bile acid receptors and Na-K-ATPase.
In: *Bile acids in health and disease*. ed. G. Paumgartner,
A. Stiehl, pp. 133-143, MTP Press, Lancaster (1977)

144. Simon, F. R., Gonzales, M., Sutherland, E., Accatino, L., Davis, R. A.:
Reversal of ethinyl estradiol-induced bile secretory failure with Triton WR 1339.
J. Clin. Invest. 65: 851-860 (1980)
145. Singer, S. J., Nicolson, G. L.:
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science, 175: 720 (1972)
146. Small, D. M.:
The physical chemistry of cholanoic acids.
in: The bile acids, Vol 1 ed. P. P. Nair, D. Kritchevsky, pp. 249-365, Plenum N. Y. (1971)
147. Sperber, I.:
Biliary secretion of organic anions and its influence on bile flow.
in: The biliary system, eds. W. Taylor, pp. 457-467 (1965)
148. Stafford, R. J., Donovan, J. M., Benedek, G. B., Carey, M. C.:
Physical-chemical characteristics of aqueous duodenal content after a fatty meal.
Gastroenterology 80: 1291-(1981)
149. Stier, A., Sackmann, E.:
Spin labels as enzyme substrates. Heterogenous lipid distribution in liver microsomal enzymes.
Biochim. Biophys. Acta 311: 400 (1973)
150. Storch, J., Schachter, D.:
A dietary regimen alters hepatocyte plasma membrane lipid fluidity and ameliorates ethinyl estradiol cholestasis in the rat.
Biochim. Biophys. Acta 798: 137-140 (1984)
151. Strasberg, S. M., Kay, R. M., Ilson, R. G., Petrunka, C. N., Paloheimo, J. E.:
Tauroolithocholic acid and chlorpromazine cholestasis in the rhesus monkey.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 57: 1138-1147 (1979)

152. Tavaloni, N., Reed, J. S., Hruban, Z., Boyer, J. L.:
Effect of chlorpromazine on hepatic perfusion and bile
secretory function in the isolated perfused rat liver.
J. Lab. Clin. Med. 94: 726-741 (1979)
153. Thureborn, E.:
Human hepatic bile. Composition changes due to altered
enterohepatic circulation.
Acta Chir. Scand. (Suppl.) 303: 1-63 (1962)
154. Turano, P., Turner, W.:
Thin layer chromatography of chlorpromazine metabolites.
J. Chromatogr. 75: 277-293 (1973)
155. Yousef, I. M., Bloxam, D. L., Phillips, M. J., Fisher, M. M.:
Liver cell plasma membrane and the origin of biliary
phospholipids.
Can. J. Biochem. 53: 989-997 (1975)
156. Yousef, I. M., Kakis, G., Fisher, M. M.:
Lithocholate-induced intrahepatic cholestasis.
Gastroenterol. 70: 996 (1976)
157. Yousef, I. M., Lewittes, M., Tuchweber, B., Roy, C. C.,
Weber, A.:
Lithocholic acid-cholesterol interactions in rat liver plasma
membrane fractions.
Biochim. Biophys. Acta 796: 345-353 (1984a)
158. Yousef, I. M., Tuchweber, B.:
Effect of lithocholic acid on cholesterol synthesis
and transport in the rat liver.
Biochim. Biophys. Acta 796: 336-344 (1984b)

Herrn Prof. Dr. A. Petter danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. V. Breuninger für die freundlichen Ratschläge und wertvollen Anregungen.

Lebenslauf

Name: Ferdinand Paul Pápa

geboren: 17.09.1953 in Budapest/Ungarn

Eltern: Ferdinand Josef Pápa und
Theodora Pápa, geb. Nyiry

Schul Ausbildung: 1960 - 1964 Volksschule in Stuttgart
1964 - 1972 Schickhardt-Gymnasium in
Stuttgart

Studium: WS 1973/74 - SS 1977
Studium der allg. Agrarwissenschaften
an der Universität Hohenheim, Stuttgart

ab WS 1977/78 Studium der Tiermedizin
an der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität, München
25.10.1983 Tierärztliche Prüfung
09.02.1984 Approbation

Beruflicher
Werdegang: Anstellung als wissenschaftliche Hilfs-
kraft im Institut für Pharmakologie und
Toxikologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München von Juni 1984 bis Februar 1986

